



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DEL SEMEN Y EL COÁGULO SEMINAL DE**  
***Macaca arctoides* Y SU RELACIÓN CON EL RANGO JERÁRQUICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MÓNICA DAFNE GARCÍA GRANADOS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LEONOR ESTELA HERNÁNDEZ LÓPEZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA**  
**“RAMÓN DE LA FUENTE MUÑOZ”**

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR**  
**INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**  
**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de agosto de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GARCÍA GRANADOS MÓNICA DAFNE** con número de cuenta **302076273**, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DEL SEMEN Y EL COÁGULO SEMINAL DE *Macaca arctoides* Y SU RELACIÓN CON EL RANGO JERÁRQUICO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. LEONOR ESTELA HERNÁNDEZ LÓPEZ**:

Presidente: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
Vocal: DR. AURELIO CAMPOS ROMO  
Secretario: DR. ROBERTO EDMUNDO MUNGUÍA STEYER  
Suplente: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
Suplente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de septiembre de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas por la formación académica que me brindó durante mis estudios de maestría en la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México y agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento que recibí a través de la beca CONACYT 314578, para la realización de la presente tesis.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, por otorgarme las facilidades para la observación y manipulación de los primates que formaron parte de este estudio, especialmente agradezco al Dr. Francisco Pellicer Graham, quien facilitó el equipo de anestesia para trabajar con los macacos. También, ofrezco mi más amplia gratitud al primatólogo Dr. Ricardo Mondragón Ceballos por compartir su conocimiento, además de asesorarme e involucrarse en esta tesis.

A la Dr. Leonor Estela Hernández López, al Dr. Alejandro Córdoba Aguilar y el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, miembros del Comité Tutoral, porque en este andar por la vida, influyeron con su conocimiento y experiencia en formarme como una persona íntegra y capaz para enfrentar los retos que pone la vida científica. Deben saber que exalto su trabajo y les agradezco con creces por ayudarme a lograr esta nueva meta, mi maestría.

## AGRADECIMIENTOS

Echo la vista atrás y reflexiono, durante el camino recorrido en el posgrado no sólo adquirí conocimientos y herramientas académicas, sino también conviví con gente valiosa que me mostró de sí misma y con ello, contribuyó a mi formación personal. Por tal motivo, quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron y acompañaron en esta experiencia de vida.

Empezaré por agradecer a dos personas a quienes admiro, respeto y valoro profundamente: la Dr. Leonor Hernández y el Dr. Alejandro Córdoba.

Leo, las preguntas científicas de interés mutuo fueron el origen de nuestra interacción cotidiana. Después, las circunstancias de vida nos llevaron a crear un vínculo de amistad fuerte. Ahora, podría agradecerte tanto, pero solo diré: ¡Leo, millones de gracias por guiarme en este camino de la ciencias y por todo el apoyo que me has dado durante estos años para seguir consolidarme y creciendo profesional y personalmente!

Alex, recuerdo perfectamente la felicidad que sentí cuando aceptaste ser parte de mi Comité Tutorial, sabía que contigo aprendería bastante y así fue y sigue siendo. Te agradezco profundamente por acompañarme hasta la culminación de esta meta. Mil gracias porque siempre alientas a la comunidad de científicos jóvenes a seguir adelante y a enfocar la vida en el sentido de producción y bienestar.

De manera especial quiero agradecer al Dr. Ricardo Mondragón Ceballos por el apoyo y la asesoría incondicional que siempre tuvo con mi proyecto de tesis. Ricardo, gracias por ayudarme a lograr este éxito.

Al Dr. Roberto Munguía Steyer, al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y al Dr. Aurelio Campos Romo por las valiosas críticas, que no sólo enriquecieron la tesis sino también sumaron reflexiones a mi pensamiento científico.

A la Biól. Olivia Peña Ramírez, porque me introdujo en el fascinante mundo del sistema social de los macacos cola de muñón. Oli, gracias por compartir tu conocimiento y enseñarme a registrar la conducta de los monkeys. Gracias porque contigo comprendí el verdadero significado del trabajo en equipo. Siempre serás mi amiga del alma.

Al Biól. Javier Borráz León por el apoyo que me brindó en varios experimentos. Jav, gracias por tu amistad, las charlas científicas y no científicas, las experiencias divertidas en los congresos y por hacerle un bien a esta sociedad al trabajar cada día por ser mejor.

También, agradezco al Dr. Claudio de la O, porque por su estudio sobre reconciliación en macacos, conocí el Instituto Nacional de Psiquiatría. Claudiñi, gracias por las conversaciones y por la orientación que me brindaste en momentos importantes.

Mil gracias a Dersu, Nelly y Gemma por su valiosa ayuda para capturar, transportar y manipular a los macacos para realizar los experimentos.

A mi padre Jesús García y mi madre Lucía Granados, quiero que sepan que los amo y les agradezco de corazón, la ayuda y el amor que me brindan. También agradezco a mi pequeña sobrina Evolet, quien mantiene un auténtico interés por el saber.

A la M. en C. María de los Ángeles Escobar, porque me ha brindado la oportunidad de involucrarme con niños y adolescentes interesados en la ciencia y tecnología en las ExpoCiencias Metropolitanas. Ángeles, lo que he aprendido contigo ha sumado a mi vida, quiero que sepas que guardo un cariño y respeto especial.

A mi entrañable amigo y excelente profesor de inglés César Martínez, contigo comparto varios de mis logros, entre ellos esta tesis.

A mi adorable amiga Roxana, gracias por escucharme en los días de incertidumbre y certeza, por ser y estar conmigo, por lo compartido desde que nos conocemos.

Agradezco profundamente a la Psic. Laura Mancera. Lau, gracias porque con tu ayuda he descubierto y construido los verdaderos cimientos de mi ser.

Finalmente, agradezco a los monkeys porque hicieron de mis días, días de cuestionamientos y reflexiones. La experiencia con los macacos ha resultado fascinante, la observación constante me permitió, no sólo comprender su comunicación y sociedad, sino también me permitió comprender muchas de las conductas de los supuestos seres humanos racionales.

*Supongamos profesor Russell que esta grabación sea vista por nuestros descendientes, como los Manuscritos del Mar Muerto, en un periodo de cientos de años. ¿Qué piensa usted que valdría la pena decirle a esa generación sobre la vida que usted vivió y las lecciones que usted de ella aprendió?*

*Me gustaría ver dos cosas: una intelectual y una moral.*

*Lo intelectual que me gustaría decirles es esto: cuando estés estudiando cualquier tema o considerando cualquier filosofía, pregúntate a ti mismo únicamente: ¿cuáles son los hechos? ¿y cuál es la verdad que los hechos sostienen? Nunca te dejes desviar, ya sea por lo que tú deseas creer o por lo que crees que te traería beneficio si así fuese creído. Observa únicamente e indudablemente cuáles son los hechos. Eso es lo intelectual que quisiera decir.*

*Lo moral que quisiera decirles es muy simple. Debo decir: el amor es sabio, el odio es estúpido. En este mundo, que cada vez se vuelve más y más estrechamente interconectado, tenemos que aprender a tolerarnos unos a los otros, tenemos que aprender a aceptar el hecho de que alguien dirá cosas que no nos gustarán. Solamente podemos vivir juntos de esa manera. Si vamos a vivir juntos, y no a morir juntos, debemos aprender un poco de caridad y un poco de tolerancia, que es absolutamente vital para la continuidad de la vida humana en este planeta.*

*Bertrand Russell, 1959.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1 Teoría de la selección sexual y competencia espermática en primates.....	3
1.1.2 Competencia espermática: características del semen y el coágulo seminal .....	6
1.2 Influencia de la testosterona sobre la producción de espermatozoides y su relación con el coágulo seminal .....	9
1.3 Relación entre la testosterona y el rango jerárquico .....	10
1.4 Conducta sexual en <i>Macaca arctoides</i> .....	11
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	14
<b>3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES</b> .....	16
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>5. MÉTODOS</b> .....	18
5.1 Sujetos de estudio .....	18
5.2 Ética de experimentación .....	18
5.3 Obtención de muestras de semen.....	18
5.4 Equipo de electroeyaculación.....	19
5.5 Evaluación del eyaculado .....	20
5.6 Análisis hormonal .....	20
5.7 Registro conductual y cálculo de rangos jerárquicos .....	20
5.8 Análisis estadísticos .....	21
<b>6. RESULTADOS</b> .....	22
6.1 Concentración espermática en el líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos.....	22
6.2 Emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos.....	25
6.3 Rango jerárquico y su relación con la concentración espermática y la probabilidad de emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos.....	26
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>9. LITERATURA CITADA</b> .....	37
<b>APÉNDICE</b> .....	46



**RESUMEN**

La competencia espermática es reconocida como una fuerza evolutiva responsable de una gran diversidad de adaptaciones conductuales, fisiológicas y morfológicas involucradas en los procesos copulatorios. En algunos primates, la alta producción de espermatozoides y frecuencia de eyaculación, así como la elevada concentración de testosterona y la formación de coágulo seminal o tapón copulatorio, son adaptaciones que han surgido para hacer frente a la intensa competencia intrasexual post-cópula. También es sabido que las características de los eyaculados podrían ser determinantes en el éxito reproductivo. Sin embargo, en primates eyaculadores múltiples se desconocen las características del semen y la frecuencia de emisión del coágulo seminal. Además, la relación entre el rango de dominancia y los rasgos de los eyaculados permanece sin estudiar. Por esta razón, se trabajó con macacos cola de muñón (*Macaca arctoides*), quienes fueron electroeyaculados cada mes, a lo largo de un año para obtener muestras sucesivas de semen por macho. Nuestros objetivos fueron los siguientes: evaluar las diferencias en la concentración espermática de eyaculados sucesivos, describir la frecuencia de emisión del coágulo seminal, determinar si las características de los eyaculados de los machos dominantes son mejores que los de machos subordinados e identificar la relación entre la concentración de testosterona y el peso del coágulo seminal. Los resultados mostraron que el eyaculado de *M. arctoides* no solo está compuesto de líquido seminal y tapón copulatorio, sino también contiene coágulo seminal, el cual presentó la mayor concentración espermática comparada con las otras dos estructuras. Por otra parte, independientemente de las estructuras seminales, la concentración espermática no varió significativamente entre los eyaculados sucesivos. Además encontramos que, sin importar el orden de la eyaculación, la frecuencia de emisión del tapón copulatorio fue mayor que la del coágulo seminal. Sin embargo, al controlar el efecto del rango jerárquico, éste se relacionó positivamente con la concentración espermática en cada eyaculado sucesivo, así como con la probabilidad de emitir tapón copulatorio y coágulo seminal. Por último, se identificó una relación positiva entre la concentración de testosterona y el peso del coágulo seminal. En conclusión, la selección sexual post-cópula ha promovido adaptaciones en los eyaculados de los macacos cola de muñón, donde las características de los eyaculados de machos dominantes parecen tener mayores ventajas reproductivas sobre los eyaculados de los subordinados en la contienda espermática. Aunque esto no es un factor determinante para fertilizar al óvulo, debido a que la elección críptica de la hembra establece las condiciones de la competencia de los eyaculados. Por lo tanto, se sugiere realizar futuras investigaciones para

conocer la interacción entre la elección críptica de la hembra y la competencia espermática en primates.

### **ABSTRACT**

Sperm competition is recognized as an evolutionary force responsible for a wide variety of behavioral, physiological and morphological adaptations surrounding copulatory processes. In some primates, the high sperm production and ejaculation frequency, as well as the high level of testosterone and the formation of seminal coagulum or copulatory plug are adaptations that have emerged as a way to deal with intense post-copulatory intrasexual competition. It is also known that the characteristics of ejaculates could be determinate in reproductive success. However, in primates with multiple ejaculations, the characteristics of the semen and the emission frequency of the seminal coagulum are still unknown. Furthermore, the relationship between the social rank and the characteristics of ejaculates remains unstudied. For this reason, we worked with stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*) who were electroejaculated every month, throughout a year to obtain successive samples of semen per male. Our objectives were the following: assess differences in sperm concentration of successive ejaculates, describe the emission frequency of seminal coagulum, determine if the characteristics of the ejaculates of dominant males are better than those of subordinate males and identify the relation between the level of testosterone and the weight of the seminal coagulum. The results showed that the ejaculate of *M. arctoides* is not only composed of seminal fluid and copulatory plug, but also of seminal coagulum, which contained the highest sperm concentration compared with the other two structures. On the other hand, regardless of the seminal structures, sperm concentration did not differ significantly between successive ejaculates. In addition, we found that, independently from sample order, the emission frequency of the copulatory plug was greater than that of the seminal coagulum. However, when we control the effect of the social rank, this effect was positively associated with the sperm concentration in each successive ejaculation as well as with the likelihood of the copulatory plug and seminal coagulum emission. Finally, I identified a positive relationship between the level of testosterone and the weight of the seminal coagulum. In conclusion, post-copula sexual selection has promoted adaptations in ejaculates of stump-tailed macaques, where the ejaculates of dominant males seem to have greater advantages over the ejaculates of subordinates in the sperm race. Although this is not a determinant factor in the fertilization of the egg, due to the fact that cryptic female choice establishes the competition conditions of the ejaculates. So, further research is suggested on the interaction between the cryptic female choice and sperm competition in primates.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Teoría de la selección sexual y competencia espermática en primates

En la teoría de la selección sexual, Darwin (1871) plantea que los caracteres sexuales secundarios (por ejemplo, el gran tamaño corporal, plumajes coloridos, cuernos aparatosos, capacidad de canto, etc.) que incrementan el éxito reproductivo individual pueden evolucionar aunque supongan un costo en la supervivencia. Dichos caracteres brindan ventajas reproductivas a los machos cuando éstos luchan por aparearse con las hembras (competencia intrasexual) o porque hacen a los machos portadores más atractivos frente a las mismas (competencia intersexual). Actualmente, se sabe que la capacidad competitiva de los individuos puede ocurrir aun después del apareamiento por medio de dos estrategias: la competencia espermática y la elección críptica femenina. La competencia espermática ocurre cuando la hembra copula y almacena gametos de varios machos dentro de su tracto reproductor y éstos compiten entre sí para fertilizar al óvulo (Parker 1970). Y la elección críptica por parte de las hembras, se refiere a la habilidad de éstas para sesgar el éxito de fertilización de un macho determinado sobre los demás con los que haya copulado (Eberhard 1996).

En primates poliándricos (Garber 1997), poligínicos (Kappeler 1997b), multimacho-multihembra (Brockman y Whitten 1996), e incluso monógamos (Sommer y Reichard 2000), las hembras promueven activamente la selección sexual antes y después de la cópula. La intensidad sexual en cada sociedad depende de dos predictores fundamentales: la proporción sexual operativa (promedio de hembras que pueden ser fertilizadas por los machos activamente sexuales en un determinado momento) (Emlen y Oring 1977) y la diferencia en la inversión parental ejercida entre los sexos (Trivers 1972). En el caso de los primates poligínicos, la tasa sexual operativa está sesgada hacia los machos y las hembras suelen encargarse de la inversión parental, por ende, la tasa reproductiva potencial (número máximo de descendientes producidos por un individuo durante su vida) (Clutton-Brock y Vincent 1991) en los machos es más alta que en las hembras. Ahora bien, en sociedades de primates multimacho-multihembra, la tasa sexual operativa de hembras varía según la especie. Por ejemplo en algunos casos, las hembras no presentan sincronía en los periodos de receptividad sexual, por lo tanto un sólo macho puede monopolizar las cópulas con la hembra fértil y resguardarla para evitar la competencia sexual post-cópula. Pero, cuando los ciclos reproductivos de las hembras están sincronizados, varios machos pueden acceder a cortejar e

inseminar a las hembras, lo que resulta en un incremento en la intensidad de la competencia espermática (Dunbar, 2000). En todos los casos, los caracteres involucrados en la reproducción presentan particularidades dependiendo de la intensidad de la selección sexual post-cópula. Actualmente, se sabe que la competencia espermática ha sido la fuerza evolutiva responsable de una gran diversidad de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y conductuales involucradas en los procesos copulatorios (Simmons 2001).

En términos generales, se ha reportado que en especies en las que existe competencia espermática, los machos presentan genitales elaborados e incluso poseen un órgano copulador que les permiten, estimular los órganos reproductores de las hembras y remover el esperma de machos rivales, favoreciendo así su propia paternidad (insectos: Waage 1979, Córdoba-Aguilar 1999, Cordero y Córdoba-Aguilar 2009; Simmons 2001; mamíferos: Simmons y Firman 2014, Stockley 2012). Otros caracteres que han sido favorecidos por la competencia espermática son: testículos grandes y un aumento en la producción de espermatozoides (mamíferos: Gomendio et al., 1998; aves: Briskie y Montgomerie 1992; anfibios: Jennions y Passmore, 1993; peces: Stockley et al., 1997; insectos: Gage 1994), semen (definido como, espermatozoides suspendidos en las secreciones del testículo y epidídimo) (García et al., 2012) de mejor calidad (espermatozoides largos, veloces, viables y longevos) (mamíferos: Gomendio y Roldan 2008, Gomendio y Roldan 1991; Malgorzata Kruczek y Józefa Strurna 2009; aves: Briskie y Montgomerie 1992, Pizzari 2007; peces: Fitzpatrick et al., 2009, Smith 2012; insectos: Oppliger et al., 2003), fluidos seminales accesorios tales como, proteínas seminales que promueven la coagulación del semen para formar un tapón que al ser depositado en el tracto reproductor de la hembra, evita o disminuye el depósito de espermatozoides de machos competidores (insectos: Simmons 1998; mamíferos: Dorus, et al., 2004; Karn et al, 2008), sustancias químicas que inducen la ovulación o anulan la posibilidad de que otro macho copule con su hembra (insectos: Poiani 2006; Kern et al., 2004; Swanson y Vacquier, 2002). En conjunto, dichas características hacen al eyaculado (definido como, líquido viscoso formado por espermatozoides suspendidos en las secreciones del testículo y epidídimo, que durante la eyaculación se mezclan con secreciones de la próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales) (García et al., 2012) más competitivo para maximizar las posibilidades de fecundar a los óvulos. Además, existen numerosas conductas características de los machos que intentan evitar o reducir la competencia espermática, algunas de éstas son: vigilancia post-cópula (insectos: Yasuoki 2007, Simmons 2001; mamíferos: Soltis 2011), cópulas prolongadas (insectos: Cordero 1990; reptiles: Olsson 2001; mamíferos: Stockley y Preston 2004), altas frecuencias copulatorias (aves: Birkhead 1998; mamíferos: Stockley y Preston 2004), múltiples

intromisiones (mamíferos: Dixon 1991, Stockley y Preston 2004) y múltiples eyaculaciones (mamíferos: Dixon 1995; Ginsberg & Rubenstein, 1990).

En el caso de los primates, los machos han desarrollado adaptaciones en las estructuras genitales y las proteínas seminales que facilitan el control de la reproducción, ya que éstas interactúan directamente con el tracto reproductor femenino (Dixon 2002). En sociedades de primates en las que la competencia espermática es intensa porque las hembras copulan con más de un macho en un mismo periodo fértil, particularmente en sistemas de apareamiento multimacho-multihembra, la evolución ha favorecido el desarrollo de testículos grandes en relación con el peso corporal (Dixon y Anderson 2004). Las pruebas experimentales muestran que existe una relación causal entre la intensidad de la competencia espermática y la masa relativa de los testículos (Hosken y Ward 2001; Pitnick et al., 2001). Además se reporta que la masa relativa de los testículos se relaciona positivamente con el éxito reproductivo (Soulsbury 2010), en este sentido, algunos autores postulan que los testículos han incrementado su tamaño para contener mayor cantidad de tejido productor de gametos (Jolly y Phillips-Conroy 2003; Schulte-Hostedde y Millar 2004). Aunque se ha sugerido que el gran tamaño testicular podría deberse a tejido intertubular, más que túbulos seminíferos (Dixon 1998).

En primates, al igual que otros animales, el riesgo de que el semen de un macho sea desplazado por el de otro, ha promovido adaptaciones tanto para prevenir el desplazamiento del propio semen como para facilitar el desplazamiento del semen de otros machos (Dixon y Anderson 2004). Algunos ejemplos característicos de estas adaptaciones son: las espinas peneales, el pene con forma sofisticada, la presencia de báculo y los patrones de intromisión especializados así como la emisión de coágulo seminal (Dixon y Anderson 2004, 2002; Fooden 1990).

Las vesículas seminales de los machos que viven en sociedades de primates multimacho-multihembra son más grandes que las que tiene los machos monógamos (Dixon 1998), pues éstas son las encargadas de secretar las proteínas que favorecen la coagulación del líquido seminal (Clark y Swanson 2005) para hacer frente a la competencia espermática (Danzy 2009). Incluso en algunas especies de primates donde la competencia espermática es intensa, los machos eyaculan un coágulo seminal más rígido (denominado “tapón copulatorio”) (Dixon 2002).

### **1.1.2 Competencia espermática: características del semen y el coágulo seminal**

Contender con la competencia espermática es fisiológicamente costoso para los animales, por tal motivo los machos han desarrollado mecanismos que reducen la probabilidad de que sus espermatozoides entren en competencia con los de otros machos o si hay competencia, que su eficiencia de fertilización sean más exitosas que las de machos rivales (Wedell et al., 2002). Si bien es cierto que la concentración espermática y la calidad del eyaculado (determinado por el porcentaje de espermatozoides móviles, viables, morfológicamente normales y con acrosoma intacto) en mamíferos determinan la capacidad competitiva del semen, el número de espermatozoides (millones de espermatozoides/ml) contenidos en el eyaculado es considerado el mejor predictor de éxito para fertilizar un óvulo en condiciones de competencia espermática (Pitnick et al., 2009b; Cameron y Rowe 2007; Pizzari 2009; Parker y Pizzari 2010; Gomendio et al., 1998).

Un estudio en el que se realizaron simulaciones matemáticas indicó que en condiciones de competencia, los machos que tuvieron la concentración más alta de espermatozoides tuvieron mayor probabilidad de ser los progenitores (Parker y Pizzari 2010). Por su parte, los estudios experimentales realizados en mamíferos demostraron que a lo largo del tracto reproductor de la hembra mueren un número considerable de espermatozoides y pocos alcanzan al óvulo, así que sólo los machos que transfieren gran cantidad de espermatozoides en el eyaculado logran tener éxito en la fertilización del óvulo (Suarez et al, 1990; Birkhead y Møller 1998).

Ahora bien, ante el riesgo de competencia bajo, es decir cuando solamente dos machos compiten y únicamente uno de ellos logra aparearse, la cantidad de eyaculado que deposita ese macho en el tracto reproductor de la hembra es grande (insectos: Gage y Baker 1991; Simmons et al., 1993). No obstante, si a la competencia se suman más rivales, la cantidad de eyaculado que deposite el macho en la hembra es menor porque la intensidad de la competencia espermática incrementa y la probabilidad de fecundación en esta situación es tan baja que no compensaría la inversión en la producción de semen (Parker y Pizzari 2010; Petersen y Warner 1998). En cambio, en condiciones de intensa competencia espermática resultaría más eficiente que un macho asigne el semen en varias hembras para incrementar su propio éxito reproductivo (Cornwallis y Birkhead 2006).

Como resultado de la competencia espermática, los espermatozoides presentan modificaciones que los hacen más aptos para competir dentro del tracto reproductor

femenino. Los estudios realizados en mamíferos, cuya competencia espermática es intensa, reportan que la longitud (Gomendio y Roldán 2008), la morfología de la cabeza (Immler et al., 2007) y la velocidad de nado (Koyama y Kamimura 2003), son características de los espermatozoides que se asocian con éxito de fertilidad. En el caso de los primates, se han documentado diferencias en las características de los espermatozoides según los distintos sistemas de apareamiento. Así, se ha reportado que la concentración espermática, la motilidad espermática, la longitud de los espermatozoides y la longitud de la pieza media de los espermatozoides, son mayores en sociedades de primates multimacho-multihembra en comparación con las especies monógamas (Møller 1989; Anderson y Dixson 2002; Dixson 1998). Otras investigaciones se han enfocado en evaluar las características de los eyaculados en sociedades de primates en las que la selección sexual post-cópula tiene una participación importante (Massaroto et al., 2010; Hernández-López et al., 2002b; Valle et al., 2004; Ke-hui Cui 1996). Particularmente en el trabajo de Hernández-López y colaboradores (2002b), encontraron diferencias interindividuales en la concentración espermática y la calidad de semen en machos mono araña. Las diferencias parecían estar relacionadas con el rango social de los animales, porque el semen de los machos dominantes, comparado con el semen de los subordinados, presentó los valores más altos en la concentración, la viabilidad y el nado lineal progresivo de los espermatozoides. En un trabajo realizado en roedores en el que evaluó el efecto del rango social sobre la concentración espermática y la calidad del semen, se reportó que los machos dominantes presentaron la mejor concentración, motilidad y viabilidad espermática, además de menor cantidad de espermatozoides anormales, que los encontrados en el semen de los subordinados (*Myodes glareolus*: Kruczek y Styrna 2009). De igual forma, en un trabajo realizado en aves, se reportó que los machos dominantes presentaron la mayor concentración espermática que los subordinados. Sin embargo, los machos subordinados presentan mejor motilidad espermática que los dominantes (*Gallus gallus*: Dornswallis y Birkhead 2007).

Otras investigaciones se han enfocado en evaluar la influencia de las eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen (Carvalho et al., 2014; Dornswallis y Birkhead 2007; Marson et al., 1989). En este último sentido, Carvalho y colaboradores (2014) reportan que en el mono aullador, la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides móviles incrementan en las últimas eyaculaciones, pero el volumen del semen y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides no varían significativamente entre los eyaculados sucesivos. En sentido opuesto, Marson (1989) muestra que en chimpancés, la concentración espermática disminuye significativamente en función de las eyaculaciones

sucesivas, aunque la fracción líquida y sólida del semen incrementan a lo largo de las mismas. Por su parte, Dornswallis y Brikhead (2007) encontraron que en gallos, la concentración espermática disminuye conforme incrementa las copulas sucesivas. También, reportaron que la motilidad espermática en machos dominantes disminuye conforme incrementan las copulas sucesivas, pero en el caso de los machos subordinados, la motilidad espermática es superior a la de los dominantes y no solo eso, sino además, incrementa a lo largo de las series copulatorias. Estas características del semen en machos subordinados, podría favorecerlos en condición de competencia espermática e incrementar sus posibilidades de fecundar al óvulo (Taborsky et al., 2008).

Por otro lado, una estructura que ha evolucionado en mamíferos como resultado de la competencia espermática es el coágulo seminal. Esta estructura se forma por la interacción de proteínas secretadas por las vesículas seminales (seminogelina 1 y 2) y enzimas prostáticas (transglutaminasa prostática específica 4 y fosfatasa ácido prostático) (Clark y Swanson 2005). El coágulo seminal reduce la probabilidad de que los espermatozoides de un macho entren en competencia con los de otros machos al bloquear el paso de los espermatozoides de los rivales (Parga 2003; Danzy et al., 2009). Otros autores proponen que el coágulo seminal podría: minimizar la pérdida de esperma al retenerlo dentro de la vagina (Dorus et al., 2004), facilitar el flujo continuo del esperma dentro del tracto reproductor femenino (Hernández-López et al., 2008) y proteger a los espermatozoides del ambiente vaginal, además de maximizar la posibilidad de fertilizar un óvulo, al mantener a los espermatozoides cerca del cuello uterino (Suarez y Pacey 2006). Relacionado con esto, Dixson y Anderson (2002) formaron categorías de coágulos seminales con información proveniente de varias especies de primates y encontraron diferencias en la consistencia del coágulo seminal entre los distintos sistemas de apareamiento. En sistemas monógamos, donde las hembras se aparean con una pareja, los machos no producen coágulo seminal, mientras que en sociedades multimacho-multihembra y dispersos, en los que las hembras copulan con múltiples individuos durante un mismo periodo fértil, los machos emiten un coágulo seminal con consistencia suave o un tapón copulatorio denso.

Recientemente, un estudio molecular mostró que la poliandria favorece la expresión de seminogelina 2, proteína encargada de controlar el volumen y la consistencia del coágulo seminal (Dorus et al., 2004). Además, este trabajo reveló que algunos macacos (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina*) y chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan*



*paniscus*), tuvieron una correlación positiva entre la densidad del coágulo seminal y el promedio de machos con los que una hembra se aparea en un solo periodo fértil.

## **1.2 Influencia de la testosterona sobre la producción de espermatozoides y su relación con el coágulo seminal**

Los testículos producen espermatozoides y secretar testosterona. Estos procesos son regulados por dos gonadotropinas pituitarias, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), ambas controladas desde el hipotálamo por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La FSH se une a receptores específicos situados en las células de Sertoli para regular la liberación de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos; mientras que la LH actúa en las células de Leydig para regular la secreción de testosterona (Baum 2002). En mamíferos, la testosterona es el principal andrógeno regulador de la espermatogénesis (Adkins 2005) y de la actividad secretora de las vesículas seminales (Gonzales, 1994). En primates, se ha reportado que los machos que viven en sistemas de apareamiento multimacho-multihembra y dispersos, tienen mayor concentración de testosterona sérica y mayor producción de espermatozoides que aquellos que viven en sistemas de apareamiento poligínicos o monógamos (Whitten 2000; Dixson 1998; Møller 1988).

Estudios realizados en primates con sistema de apareamiento disperso y con estacionalidad reproductiva no estricta, reportan que tanto la concentración de testosterona como la concentración espermática incrementan significativamente en la época reproductiva, lo que sugiere que la testosterona podría subyacer a la competencia espermática (Di Bitetti y Janson 2000; Cerda-Molina 2009). Sin embargo, otros estudios plantean que la concentración de testosterona podría incrementar durante la época reproductiva para promover los encuentros agresivos entre los machos, debido a la competencia intrasexual (Møller y Wrangham 2004a; Klindkova et al., 2004; Takahashi 2004).

Por otra parte, en mamíferos la actividad secretora de las vesículas seminales es dependiente de andrógenos (Gonzales, 1994; Lieber et al., 1980). Los experimentos en ratones muestran que la elevación de la concentración de testosterona sérica incrementa: la actividad secretora de las vesículas seminales (Higgins y Burchell 1978; Zanato et al., 1994) y el peso de las vesículas seminales (Almenara 2000). Por otra parte, Carpino y colaboradores (1994) identificaron que la aplicación de altas dosis de propionato de testosterona disminuye el funcionamiento de estas glándulas.

Las vesículas seminales es secretar seminogelina 1 y 2, proteínas que al interactuar con transglutaminasa prostática específica 4 y fosfatasa ácido prostática, provocan la coagulación del líquido seminal (Clark y Swanson 2005). Algunos estudios han reportado que el decremento en la actividad de las vesículas seminales resulta en la disminución de la coagulación del semen (Mandal y Bhattacharyya 1985), y una ligera coagulación afecta negativamente la motilidad espermática (Mandal y Bhattacharyya 1987).

### **1.3 Relación entre la testosterona y el rango jerárquico**

La dominancia social es un tema central en el estudio de la conducta animal ya que el rango jerárquico determina las interacciones sociales, el éxito en la obtención de recursos y el éxito en la reproducción (Hemelrijk et al., 2005).

Es sabido que los recursos en el ambiente no son infinitos, incluso en ambientes abundantes, éstos no son divididos igualitariamente entre los individuos. Así, la competencia intrasexual y la lucha por territorio y alimento, promueve el establecimiento de rangos jerárquicos a través de encuentros agonistas (conductas agresivas y sumisivas) (Hemelrijk et al., 2005). Estas interacciones agonistas entre los conespecíficos promueven cambios fisiológicos en los individuos, particularmente en la secreción de dos hormonas: la testosterona y el cortisol (Anestis 2010).

La testosterona en los machos no sólo modula los cambios fisiológicos ocurridos durante la madurez sexual (por ejemplo, el desarrollo de la anatomía reproductiva y de los caracteres sexuales secundarios, el crecimiento de los huesos, la espermatogénesis, etc.) (Terasawa y Fernandez 2001), sino también regula las conductas agresivas durante periodos de intensa competencia intrasexual (Møller y Wingfield 2004; Whitten 2000). Relacionado con esto, Wingfield (1990) postuló que la concentración de testosterona regula las conductas agresivas cuando la posición social se encuentra desafiada o durante periodos de intensa competencia intrasexual, una idea denominada la hipótesis del desafío. En especies de primates con reproducción estacional se ha demostrado que la concentración de testosterona de los machos y el número de interacciones agresivas incrementan en presencia de hembras fértiles y no durante otras fases de su ciclo menstrual (Sobolewsk 2013; Ostner et al., 2002; Cavigelli y Pereira 2000). Mientras que en primates con reproducción no estacional, la hipótesis del desafío parece estar regulada por la inestabilidad en los rangos jerárquicos más que por la competencia intrasexual (Møller 2002; Bergman et al., 2006).

Ahora bien, la dominancia social confiere varias ventajas, una de las más importantes es el acceso a copular con hembras fértiles. En primates, los machos dominantes tiene mayor éxito de apareamiento (Brauch et al., 2007; Alberts et al., 2006; Takahashi 2004) y mayor éxito reproductivo (Setchell et al., 2005; Widdig et al., 2004; Dunbar y Cowlshaw 1992) que los machos subordinados.

No obstante, actualmente se sabe que las cópulas clandestinas y la coerción sexual realizadas por machos subordinados, además de la sincronización de los ciclos ovulatorios y la elección de la hembra, son fuentes que confieren variación al éxito reproductivo de los machos dominantes (Soltis et al., 2011; Ostner et al., 2008, Drea 2005).

El cortisol es una hormona esteroide secretada en respuesta a estrés fisiológico, ambiental o social (Nelson 2000). Sapolsky (2004) explica que un individuo afectado por un factor estresante presenta un incremento en la concentración de cortisol, lo que favorece la liberación de reserva de energía para actuar de manera inmediata ante una situación peligrosa; pero, esta misma hormona secretada en forma crónica acarrea consecuencias filológicas negativas, como la supresión del sistema reproductivo e inmune. En algunas sociedades de primates, generalmente lo machos subordinados experimentan estrés crónico, por ende sus concentraciones de cortisol basal son mayores que los machos dominantes (Sapolsky 2005; Bergman et al., 2005; Abbott et al., 2003). Sin embargo, en periodos de inestabilidad social o en épocas de escasos recursos alimenticios, los machos dominantes presentan aun mayores concentraciones de cortisol que los machos subordinados (Bergman et al., 2005; Møller y Wrangham 2001).

#### **1.4 Conducta sexual en *Macaca arctoides***

*Macaca arctoides*, también conocido como macaco cola de muñón, es un primate gregario que presenta dimorfismo sexual, lo que sugiere que hay competencia entre machos y selección de pareja por parte de las hembras (Andersson 1994), además forma sociedades cuya organización se rige por un sistema jerárquico lineal (Santillán-Doherty et al., 1991). Su sistema de apareamiento es multimacho-multihembra, en las que las hembras promueven competencia espermática porque pueden copular con varios machos en un mismo periodo fértil (Dixson 1998). En las relaciones sexuales los individuos de esta especie presenta preferencias por interactuar con individuos de distinto rango y la misma edad. El macho alfa

tienden a monopolizar las cópulas con las hembras receptivas, permanecer en contacto, cercanía o aseando a la hembra como una forma de alejar a los competidores, mientras que los machos subordinados copulan clandestinamente con ellas o las hostigan hasta conseguir montarlas e inseminarlas (Fooden 1990). Este tipo de relaciones son selectivas y ocurren de manera preferencial entre individuos en periodos de receptividad.

*M. arctoides* se caracteriza por presentar una alta frecuencia de cópulas y eyaculaciones en periodos cortos de tiempo con una misma o varias hembras, se reporta que realiza hasta 11 cópulas en 66 min, con un promedio de 12-21 min entre cada eyaculación (Niemeyer y Chamove 1983); además de ser la única especie del Género *Macaca* que presenta la conducta par-sentado post-eyaculatorio o candado copulatorio (Goldfoot et al., 1975).

El eyaculado del macaco cola de muñón está formado por una porción líquida de semen y otra porción sólida de semen (tapón copulatorio) (Kanagawa et al., 1972; Dixson 2002). Dixson (1987) sugirió que durante el candado copulatorio, el tapón copulatorio se ajusta en el tractor reproductor femenino para bloquear el paso del semen de posibles machos competidores. Aunque algunos investigadores han reportado que, una vez que la pareja se separa del par-sentado, ocasionalmente la hembra se retira el tapón copulatorio o el macho entre cada cópula extrae el tapón directamente de la vagina (Chevalier-Skolnikoff 1975).

En primates, la estimulación sexual ocurre cuando los machos están en proximidad con una hembra o varias hembras fértiles. Sin embargo, contrario a otros mamíferos (ratas: Beach y Jordan 1956; gatos: Whalesn 1963; ovejas: Pepelko y Clegg 1965, etc.), el efecto Coolidge (conducta caracterizada por el restablecimiento de la actividad sexual de un macho después de la saciedad sexual cuando una nueva hembra fértil es presentada al macho previamente saciado) (Bermant 1976) en primates no ha sido estudiado sistemáticamente. Recientemente, un experimento en experimento en mamíferos ha mostrado que a machos sexualmente saciados, al presentarles hembras nuevas fértiles, realizan patrones conductuales de eyaculación pero son incapaces de emitir semen en el tracto reproductor de las mismas. Así, en organismos en los que la competencia espermática es intensa, el efecto Coolidge presentado por los machos y las eyaculaciones sucesivas sin emisión de semen, les permite seguir compitiendo sexualmente al interferir en la fecundación del macho rival, al desplazar el tapón copulatorio que haya depositado en el tracto reproductor femenino (Tlachi-López, et al., 2012; McClintock et al., 1982).

Sin embargo en primates, solo se ha reportado que además de las hembras fértiles, la motivación de la cópula en un macho se dispara cuando éste detecta que otro macho también está copulando. En este sentido, un experimento realizado en *M. nemsetrina* mostró que tiempo del intervalo post-eyaculatorio se reduce un 60% cuando un macho observó a un segundo macho copulando con su pareja. Esta conducta también ha sido observada en *M. nigra*, *Miopithecus talapoin*, *Mandrillus sphinx*, *Erythrocebus patas* (Dixson 1998; Ohsawa et al., 1993).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha reportado que el semen de *M. artoides* consta de líquido seminal y tapón copulatorio (Dixson 2002; Kanagawa 1972), pero hasta ahora no existen trabajos en los que se haya estudiado sistemáticamente las características de ambas estructuras seminales. Además, al ser un primate que eyacula de manera sucesiva, se desconoce la frecuencia de emisión del tapón copulatorio. Estudios realizados en algunos mamíferos proponen que el tapón copulatorio es importante en la competencia espermática. Se sugiere que la principal función del tapón copulatorio es bloquear el paso de los espermatozoides de machos rivales que intentan dirigirse al trato reproductor femenino (Danzy 2009); aunque también se le atribuyen funciones alternativas tales como, minimizar la pérdida de espermatozoides al impedir que éstos se derramen del tracto reproductor de la hembra (Dorus et al., 2004) o proteger y liberar a los espermatozoides hasta que alcancen el cérvix (Hernández-López et al., 2008; Surez y Pacey 2006).

Ahora bien, *M. arctoide*, como se dijo antes, copula y eyacula de forma múltiple (Niemeyer y Chamove 1983). De tal forma que si el tapón copulatorio bloqueara el paso del eyaculado de los machos rivales, también bloquearía el del propio macho que ha copulado, lo que pondría en riesgo su propio éxito reproductivo.

Asimismo, en algunos macacos el coágulo seminal (*M. mulatta*: Fordney-Settlage et al., 1974; *M. fuscata*: Clark 2005) o el tapón copulatorio (*M. mulatta*: Thomsen 2013) son expulsados después de una porción líquida de semen donde están contenidos los espermatozoides. Si esto también ocurre en *M. artoides*, entonces la función del tapón copulatorio como estructura protectora, no sería tan útil como ocurre en otras especies en las que los espermatozoides están contenidos en el coágulo seminal (*Ateles geoffroyi*: Hernández-López et al., 2002).

Por otra parte, en primates, las proteínas principales para la coagulación del semen son secretadas por las vesículas seminales (Dorus 2004), las cuales son glándulas andrógeno dependientes (Poiani 2006; Gonzales, 1994; Lieber et al., 1980).

Dado que las sociedades de macacos cola de muñón establecen un sistema jerárquico lineal (Santillán-Doherty et al., 1991), y en algunas especies de primates la testosterona se relaciona positivamente con el rango jerárquico de los machos (Wickings et al., 1992; Bergman et al.,

2006), se ignora, por un lado, si la testosterona podría regular el peso de tapón copulatorio emitido en el eyaculado; y por otro lado, si el peso del coágulo seminal podría variar en función del rango jerárquico.

A partir de lo que se conoce sobre la frecuencia de eyaculación, el tapón copulatorio, las vesículas seminales, la testosterona y el rango jerárquico en primates y en particular de *M. artoides*, se plantean varias predicciones que dirigen el desarrollo del presente trabajo.

### 3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Producir espermatozoides y eyacular son procesos costosos para los primates, por lo tanto en primates que eyaculan de manera múltiple deberá existir diferencia entre la concentración espermática de los eyaculados sucesivos. Por otra parte, en monos del Género *Macaca* se ha reportado que los machos dominantes presentan mayor éxito reproductivo que los machos subordinados, por lo tanto se espera que existan diferencias interindividuales en la concentración espermática y que éstas se asocien con el rango jerárquico de los animales en estudio, siendo los machos dominantes los que presenten las mayores concentraciones espermáticas.

Dada la frecuencia de eyaculación, el sistema jerárquico lineal en los machos y la competencia espermática en *M. arctoides*, se espera que:

- 1) La concentración espermática incrementa significativamente entre los eyaculados sucesivos.
- 2) El tapón copulatorio contenga espermatozoides y que esta estructura seminal se emita en la última eyaculación.
- 3) El rango de dominancia se relacione positivamente con la concentración espermática en los eyaculados sucesivos.
- 4) El rango de dominancia se relacione positivamente con la probabilidad de emitir tapón copulatorio en cada eyaculación.
- 5) El peso del tapón copulatorio aumente significativamente en función de la concentración de testosterona.



#### 4. OBJETIVOS

- Determinar si existe variación en la concentración espermática y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos del macaco cola de muñón y averiguar si éstas se relacionan con el rango jerárquico de los animales en estudio.
- Describir la frecuencia de emisión del tapón copulatorio en eyaculaciones sucesivas.
- Averiguar si la concentración de testosterona determina el peso del tapón copulatorio en este macaco.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Sujetos de estudio

Para este experimento se trabajó con cinco machos adultos macacos cola de muñón (*M. arctoides*) en una rango de edad de 10 a 20 años. Estos macacos viven en cautiverio exterior en una jaula trapezoidal de 1339m<sup>3</sup> (además de espacio adicional conformado por seis plataformas de 1.5m de profundidad X 6m de longitud X 1.8m de altura, escaleras, resbaladillas, columpios y otros aparatos para jugar) en el Departamento de Etología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, en la Ciudad de México. Durante el estudio, los machos compartieron el encierro con 15 hembras adultas, 6 infantes y otro macho adulta, que no fue incluido en el experimento porque resultó ser azoospermico. Todos los animales tienen acceso continuo a beber agua y son alimentados diario con fruta y vegetales frescos, además de una dieta comercial para primates (5038 Lab Diet PMI Feeds, Inc., St Louis, MO, USA).

### 5.2 Ética de experimentación

El Comité de Bioética del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” aprobó el protocolo experimental y el manejo de los animales de estudio. Para los experimentos se siguió la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO,1999), Especificaciones técnicas para producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la declaración de política para el uso de primates con fines biomédicos, aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Grupo de Conservación de Ecosistemas (ECG).

### 5.3 Obtención de muestras de semen

Se realizaron 55 experimentos (11 por macho) de agosto del 2011 a julio del 2012 (a excepción de diciembre del 2011). Las muestras de semen fueron obtenidas mensualmente. El semen de todos los machos se obtuvo en 3 días consecutivos porque se trabajó con uno o dos machos por día. El primer experimento inició a las 08:00h y terminó alrededor de las 10:00h, la segunda sesión experimental inició a las 11:00 y finalizó a las 13:00h. Se ha reportado que los machos macacos cola de muñón eyaculan varias veces con una misma hembra y realizan

intervalos de tiempo corto entre cada eyaculación (eyaculadores múltiples) (Bertrand, 1969; Kanagawa et al., 1972). Por tal motivo, de cada macho se obtuvieron 3 muestras de semen sucesivas en una misma sesión experimental, dejando 10 minutos de intervalo post-eyaculatorio entre cada electroeyaculación lograda (n=165). El semen se obtuvo por electroeyaculación. Para ello, los días de experimento, cada macho aprendió a entrar en una jaula de restricción (1.5m de profundidad X 1m de ancho X 1m de altura) donde fue preanestesiado con Ketamina (10 mg/Kg i.m.; Anesteck CpMAX S.A. de C.V. México, D.F.), esto permitió su traslado hasta la cama quirúrgica para ser anestesiado con Isoflurano inhalado. La electroeyaculación consistió en introducir un electrodo lubricado (20mm de diámetro, 11cm de longitud) en el recto hasta posicionarlo cerca de la próstata (aproximadamente a 8cm de profundidad). El primer estímulo fue de 4V. Se realizaron 5 repeticiones de 20s, con 5s de descanso entre estimulación. Posteriormente se incrementó la potencia en 1V y se realizó el mismo tren de estimulación. Simultáneamente el pene fue estimulado manualmente. El tiempo total para obtener cada muestra de semen fue de 10 min, pocas veces fue necesario sobrepasar los 6V y se vigiló que la intensidad de corriente eléctrica no fuera mayor a 150 mA. Una vez obtenidas las 3 muestras de semen, se regresó al animal a la jaula de restricción para que se recuperara de la anestesia. Posteriormente fue hidratado, alimentado y liberado a su hogar.

#### **5.4 Equipo de electroeyaculación**

Se construyó un electrodo de eyaculación con acrílico dental (22mm de diámetro, 11 cm de longitud) y dos tiras de cobre (1cm de ancho x 14.5cm de longitud) que se colocaron paralelamente a la base de acrílico. El equipo utilizado para transmitir la corriente eléctrica consistió en un amplificador (Pionero A-205, Corp. Electrónica Pioneer, Kuala-Lumpur, Malasia) con 55 W de salida por canal y corriente continua de 10,000 Hz con filtro electrónico; dos multímetros digitales (PROAM 602-040, PROAN, Beijing, China) que miden el voltaje conductor y el total de mA de corriente del electrodo; un generador de forma de onda (GoldStar FG-8002, GoldStar Compañía de Precisión Ltd., Seúl, Corea); y un transformador de aislamiento electrostático (1:1 aislamiento de línea, 90 W de capacidad de poder).

### **5.5 Evaluación del eyaculado**

Las muestras del eyaculado se colectaron en diferentes tubos Ependorf, de acuerdo a su consistencia (líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio). En las 3 electroeyaculaciones seriadas se registró la presencia o ausencia del tapón copulatorio o coágulo seminal y en caso de su emisión fueron pesados. Siguiendo los criterios del Manual de procesamiento de semen humano de la Organización Mundial de la Salud (2010), se cuantificó la concentración espermática del líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio en una cámara de Neubauer. El coágulo seminal y el tapón copulatorio fueron diluidos con tripsina al 2.5%, ya que gran cantidad de los espermatozoides se encuentran contenidos dentro de estos componentes gelatinosos. La cámara de Neubauer se llenó con 10 $\mu$ l de cada muestra. Se utilizó un microscopio de luz (Standard 25 ICS Transmitted Light Microscope; Carl Zeiss, Germany). Se realizaron dos conteos espermáticos por cada muestra, si la cuenta difería en un 10% o más, entonces ésta se descartó y reemplazó por una muestra nueva. La concentración espermática fue expresada en millones de espermatozoides por ml.

### **5.6 Análisis hormonal**

Se tomaron 3ml de muestra de sangre por macho al principio de cada experimento para evaluar la concentración de testosterona y cortisol. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 30min y los sueros se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. La testosterona en suero se midió por radioinmunoensayo utilizando kits comerciales (125I RIA Kit Coat-A-Count, DPC, Los Angeles, CA, USA).

### **5.7 Registro conductual y cálculo de rangos jerárquicos**

Los datos conductuales fueron obtenidos por muestreo de conducta focal (Altman 1974). De lunes a viernes en el periodo de las 10:00h a las 12:00h, se registraron las interacciones agresivas y sumisivas, identificando al emisor y receptor de cada conducta. El índice de dominancia de todos los animales (excepto infantes) se calculó mensualmente. Para ello, se realizaron socimatrices de ganadores-perdedores (calculado como: agresiones dadas de A a B + sumisiones recibidas de A por B), que fueron usadas para calcular la puntuación de dominancia de David (Gammell et al., 2003) en el paquete R “steeness”.

## 5.8 Análisis estadísticos

Dado que los valores de la concentración espermática y la concentración de testosterona no presentaron una distribución normal, fueron transformados a logaritmos naturales (Ln).

Para contrastar la concentración de espermatozoides entre las eyaculaciones sucesivas se utilizó un modelo lineal mixto para muestras repetidas, porque esta prueba estadística permite controlar el efecto de las muestras repetidas (3 electroeyaculaciones por mes x animal, a lo largo de 11 meses).

Para comparar la frecuencia de emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio por eyaculación sucesiva, se empleó una prueba  $\chi^2$ .

Para evaluar el efecto del rango jerárquico sobre la concentración espermática por eyaculado sucesivo se utilizó un modelo lineal mixto, y para estimar la probabilidad de emisión del coágulo seminal por eyaculado sucesivo se utilizó un modelo de regresión logística de ecuación de estimación generalizada. En ambos casos, los efectos fijos fueron: el puntaje de dominancia de David, el orden de la muestra (eyaculación 1, 2 y 3) y la interacción de el puntaje de David x el orden de la muestra. Los efectos aleatorios fueron: los animales considerados como identidades, la fecha de la muestra de experimento y el orden de la muestra. Se utilizó un modelo autorregresivo heterogéneo para modelar la covarianza de los efectos aleatorios, este modelo fue empleado dado que los días transcurridos entre cada experimento variaron.

Para evaluar la relación entre la concentración de testosterona y el peso del tapón copulatorio se utilizó un modelo lineal mixto para muestras repetidas. El mismo modelo se empleó para evaluar la relación entre el rango jerárquico y el peso total del coágulo (coágulo seminal + tapón copulatorio). En ambos casos, los efectos aleatorios fueron: los animales considerados como identidades y la fecha de la muestra de experimento. Además, se utilizó un modelo autorregresivos heterogéneo para modelar la covarianza de los efectos aleatorios.

Todas las pruebas se realizaron en SPSS 17 y en todos los casos se estableció como prueba de significancia un valor  $p \leq 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Concentración espermática en el líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos

En el eyaculado del macaco cola de muñón (*M. arctoides*) se identificaron tres estructuras seminales (Fig. 1). Se realizaron 165 electroeyaculaciones y se obtuvieron 309 muestras (N=153 líquidos seminales, N=55 coágulos seminales y N=91 tapones copulatorios) (cuadro 1).

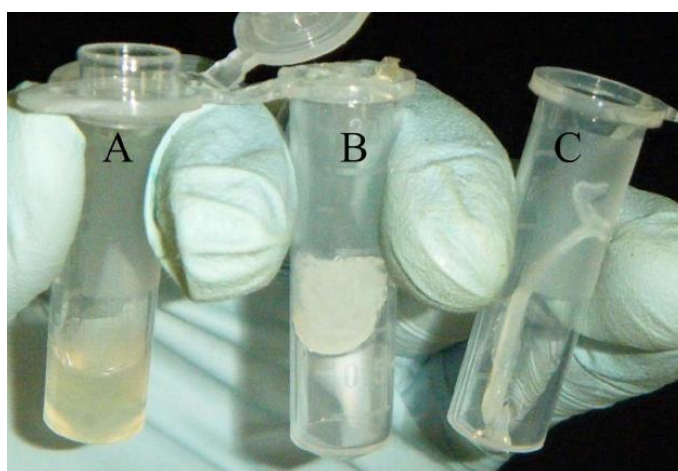


Fig. 1 Estructuras seminales del eyaculado del macaco cola de muñón: a) líquido seminal, b) coágulo seminal y c) tapón copulatorio

Cuadro 1. Cantidad de muestras obtenidas por estructura seminal en tres eyaculaciones sucesivas de *M. arctoides*.

Estructura Seminal	Primera eyaculación	Segunda Eyaculación	Tercera eyaculación	Total
Líquido seminal	53	51	49	153
Coágulo seminal	21	19	15	55
Tapón copulatorio	32	28	31	91

El volumen del líquido seminal (media  $\pm$  error estándar de la media) fue  $0.3 \pm 0.01$  ml. El peso del peso coágulo seminal fue  $0.53 \pm 0.05$  g, mientras que el peso del tapón copulatorio fue  $0.31 \pm 0.02$  g.

La figura 2 muestra la variación de la concentración espermática encontrada en cada estructura seminal a través del año de estudio.

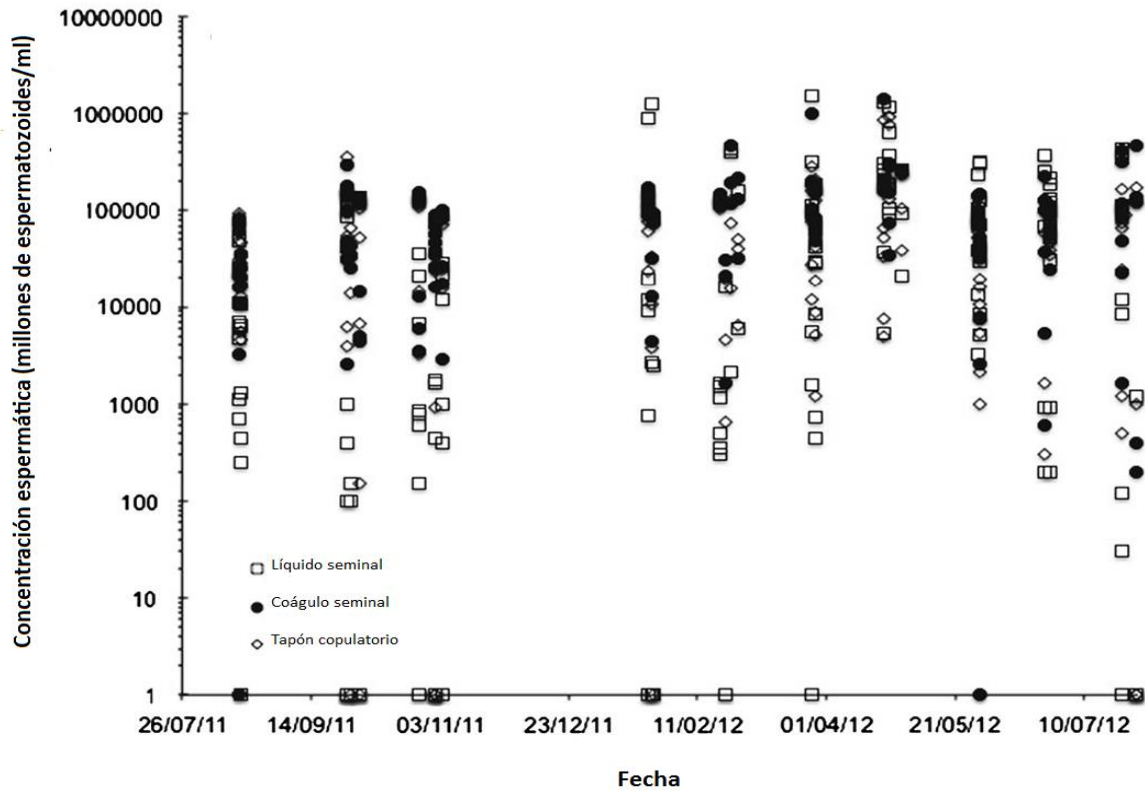


Fig. 2 Variación en la concentración espermática (millones de espermatozoides/ml) en el líquido seminal (cuadros), coágulo seminal (círculos sombreados) y tapón copulatorio (rombos) a lo largo del año de estudio.

El modelo lineal mixto reveló que la concentración espermática difirió significativamente entre las estructuras seminales [ $F(2,488)=49.1$ ,  $P<0.0001$ ] (Fig. 3), pero no varió significativamente a través de las electroeyaculaciones sucesivas [ $F(2,155.06)=1.64$ ,  $P=0.2$ ].

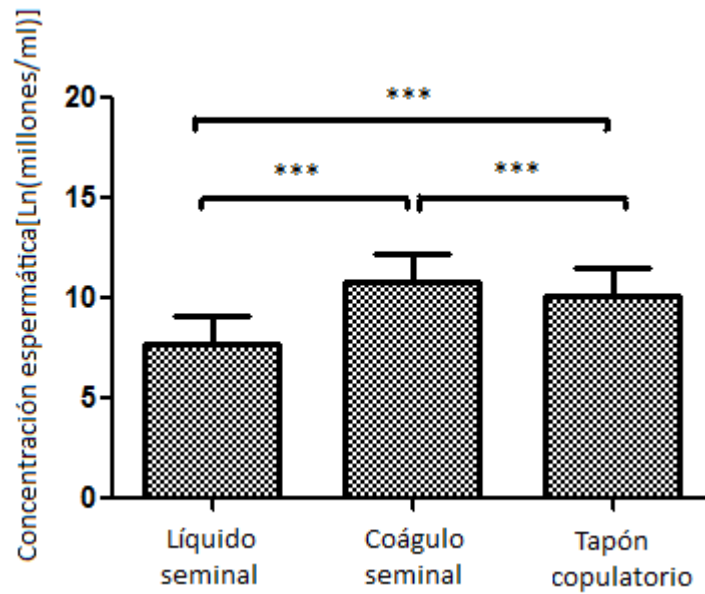


Fig. 3 Diferencias en la concentración espermática en las estructuras seminales del macaco cola de muñón. El coágulo seminal contuvo la mayor cantidad de espermatozoides [media ± desviación estándar = 10.86 ± 1.4 [Ln(millones/ml)], seguido por el tapón copulatorio (10.11 ± 1.4) y el líquido seminal (7.7 ± 1.4). \*\*\*( $P < 0.001$ ).

La Figura 4 muestra la variación de la concentración de testosterona a lo largo del año de estudio.

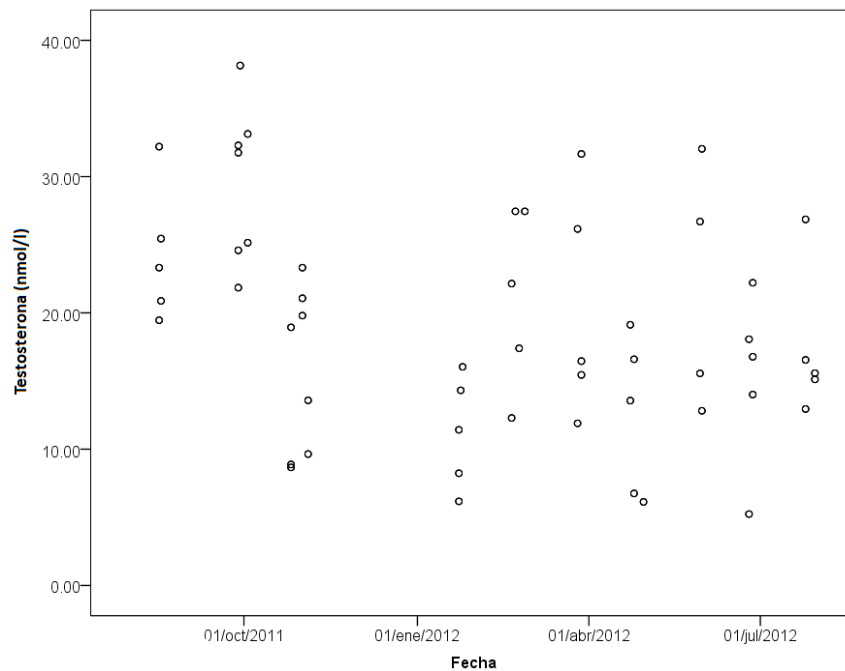


Fig. 4 Variación mensual de la concentración de testosterona de machos macacos cola de muñón a lo largo de año de muestreo.



El modelo lineal mixto mostró que la concentración de testosterona se relacionó de manera negativa con la concentración espermática ( $b \pm$  error estándar =  $-0.5 \pm 0.1$  nmol/l;  $t = -2.7$ ,  $P < 0.01$ ) y con el volumen del líquido seminal ( $-0.2 \pm 0.09$  ml;  $t = -2.5$ ,  $P < 0.01$ ).

## 6.2 Emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos

El tapón copulatorio y el coágulo seminal no se emitieron en todas las electroeyaculaciones. El tapón copulatorio se emitió el 55 % de todos los casos, independientemente del orden de la muestra ( $X^2_2 = 0.64$ ,  $P = 0.8$ ); mientras que el coágulo seminal no se presentó el 70 % de las veces, también independientemente del orden la muestra ( $X^2_2 = 1.53$ ,  $P = 0.5$ ) (Fig.5).

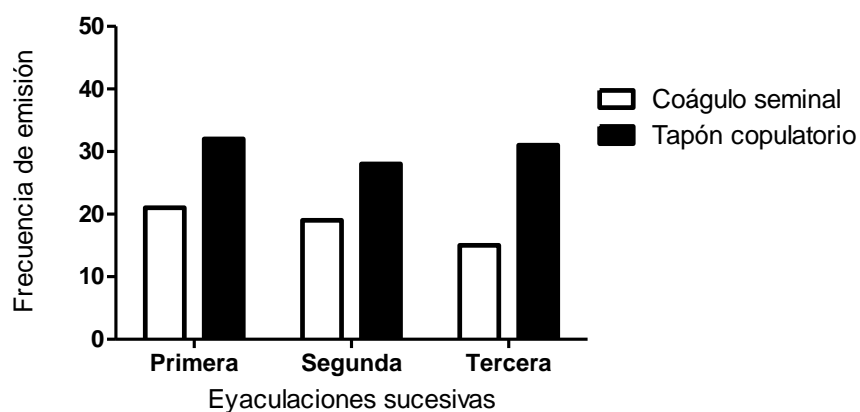


Fig. 5 Frecuencia de emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculaciones sucesivas de *M. arctoides*.

Por su parte, la concentración de testosterona se relacionó positivamente con el peso total de coágulo seminal (coágulo seminal + tapón copulatorio) ( $b \pm$  error estándar =  $0.007 \pm 0.003$ ;  $t = 2.25$ ,  $P < 0.05$ ).

### 6.3 Rango jerárquico y su relación con la concentración espermática y la probabilidad de emisión del coágulo seminal y tapón copulatorio en eyaculados sucesivos

A partir de 9,747 conductas agonistas observadas se obtuvo el rango jerárquico de cada individuo. En la Figura 6 se muestra el puntaje de dominancia de David mensual correspondiente a cada macho *M. arctoides* adulto.

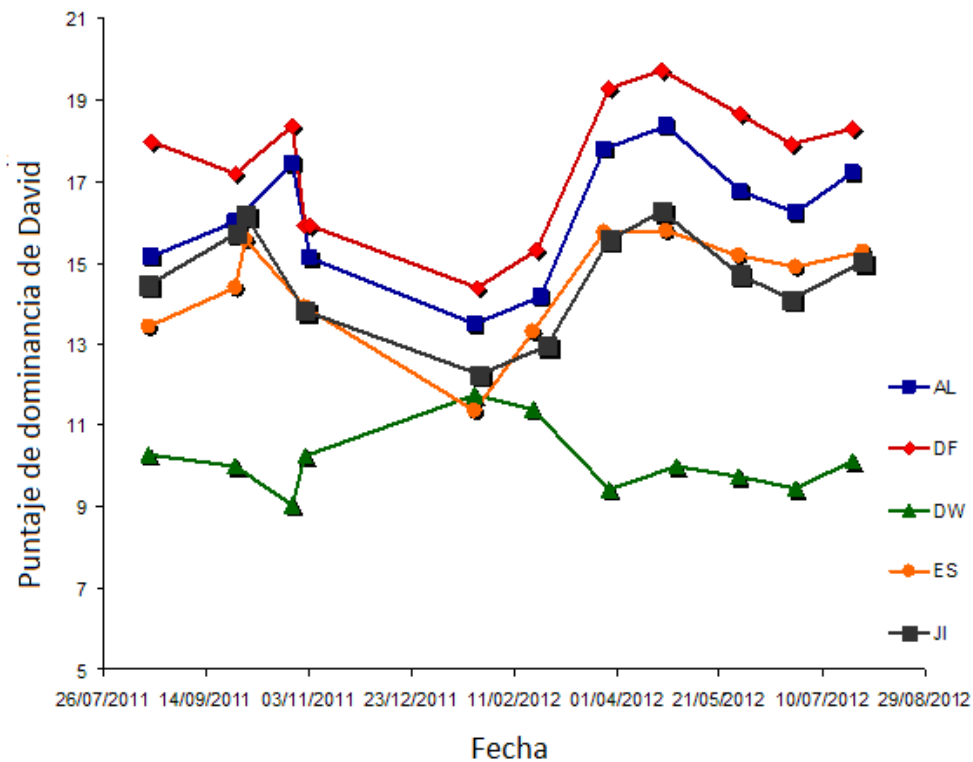


Fig. 6 Rangos jerárquicos mensuales de 5 machos adultos macaco cola de muñón calculados a lo largo de un año de observación. A mayor puntaje de David, mayor grado de dominancia social.

Por un lado, el modelo lineal mixto reveló una relación positiva entre el rango jerárquico y la concentración de testosterona ( $b \pm \text{error estándar} = 1.14 \pm 0.53$ ;  $t = 2.11$ ,  $P < 0.05$ ). Por otro lado, se encontró que el rango jerárquico influyó en la concentración espermática en cada eyaculación sucesiva ( $F_{2,2.6} = 2588.2$ ,  $P < 0.0001$ ). En la primera eyaculación, el rango jerárquico no se relacionó significativamente con la cuenta espermática ( $b \pm \text{s.e.} = 0.21 \pm 0.28$ ,  $t_{19.9} = 1.14$ ,  $P = 0.27$ ; Fig. 7a), mientras que en la segunda eyaculación ( $b \pm \text{s.e.} = 0.39 \pm 0.18$ ,  $t_{28.4} = 2.11$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 7b) y en la tercera ( $b \pm \text{s.e.} = 0.38 \pm 0.17$ ,  $t_{11.15}$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 7c), la concentración espermática incrementó significativamente a mayor puntaje de dominancia de David. No existieron diferencias significativas entre las pendientes de cada eyaculación sucesiva (primera eyaculación vs segunda eyaculación,  $t_{100} = 0.54$ ,  $p = 0.59$ ; primera eyaculación vs tercera eyaculación,  $t_{98} = 0.051$ ,  $p = 0.6$ ; y segunda eyaculación vs tercera eyaculación,  $t_{96} = 0.04$ ,  $p = 0.97$ ).

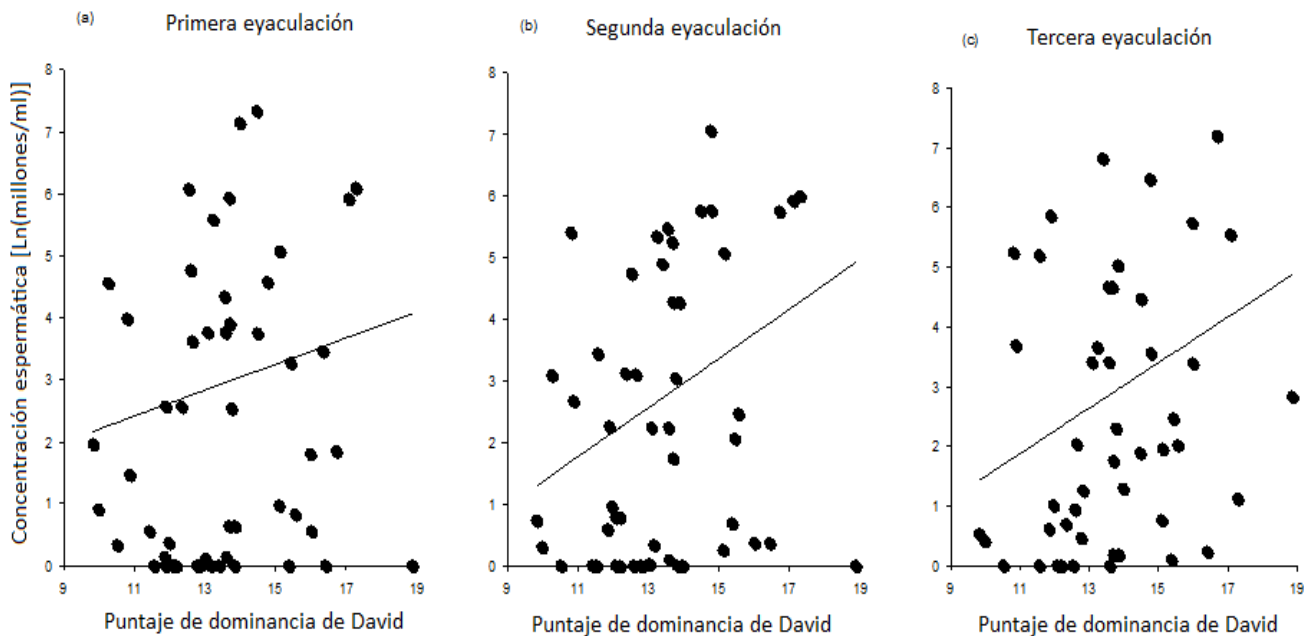


Fig. 7 Efecto del rango jerárquico en la concentración espermática en tres eyaculaciones sucesivas en *M. arctoides*.

La probabilidad de emitir tapón copulatorio incrementó 1.23 veces ( $\exp(b)$ ) conforme aumentaba el rango de dominancia, ( $b \pm$  error estándar =  $0.2 \pm 0.04$ ; Wald- $X^2_1=24.6$ ,  $P<0.0001$ ). Mientras que la probabilidad de que el coágulo seminal estuviera presente en el eyaculado se relacionó significativamente tanto con el rango jerárquico, como con el orden de las eyaculaciones (Wald- $X^2_2=10.28$ ,  $P<0.01$ ).

La Figura 8 muestra las probabilidades de emitir coágulo seminal en cada eyaculación sucesiva en función del puntaje de dominancia de David. Se observa que la probabilidad de emitir coágulo seminal incrementó significativamente con el rango jerárquico en la primera ( $0.17 \pm 0.06$ ; Wald- $X^2_1=8.09$ ,  $P<0.01$ ) y en la segunda ( $0.03 \pm 0.01$ ; Wald- $X^2_1=8.04$ ,  $P<0.01$ ) eyaculación, pero no en la tercera ( $0.09 \pm 0.05$ ; Wald- $X^2_1=2.95$ ,  $P=0.08$ ).

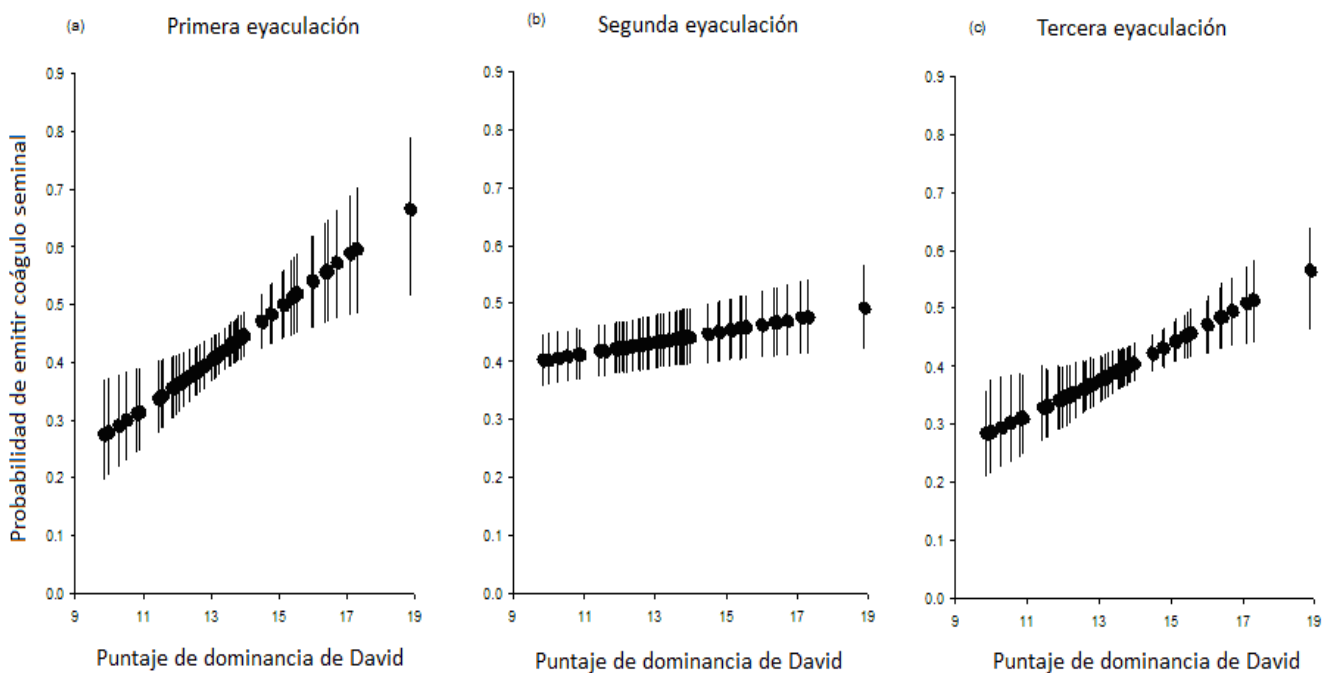


Fig. 8 Probabilidad de emitir coágulo seminal en tres eyaculaciones sucesivas en función del rango jerárquico de machos macacos cola de muñón.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la variación en la concentración espermática del eyaculado, se describió la frecuencia de emisión de las porciones sólidas del semen, se averiguó si existían diferencias interindividuales en los eyaculados sucesivos de macacos cola de muñón y se evaluó si éstas se relacionaron con el rango jerárquico de los animales en estudio. Ahora bien, es necesario aclarar que, a diferencia de otros organismos (por ejemplo, insectos y aves, Cornwallis y Birkhead 2007), la manipulación de primates no humanos es más compleja, y a la fecha, se sigue trabajando en establecer algún método que permita obtener las muestras de semen de forma natural para evaluar las características del eyaculado depositado en las hembras.

Es claro que en primates las características del eyaculado (volumen, concentración espermática, presencia del coágulo seminal, etc.) están influenciadas por factores socioecológicos. Por tal motivo, si se obtienen muestras seminales por métodos artificiales como es la electroeyaculación, es posible que éstas puedan no ser equiparables. Sin embargo, por décadas la electroeyaculación ha sido el método elegido para obtener muestras de semen y describir de manera sistemática las características del eyaculado en diversas especies de mamíferos, sin que por esto los resultados dejen de ser útiles.

En el presente trabajo encontramos que, distinto a lo reportado en la literatura (Kanagawa et al., 1972; Dixson 2002), el eyaculado del macaco cola de muñón no solo está constituido por líquido seminal y tapón copulatorio sino también contiene coágulo seminal. Asimismo, se encontró que en cada estructura seminal (líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio) habían inmersos espermatozoides, cuya concentración espermática varió significativamente entre cada una de ellas, siendo el coágulo seminal, el componente que contuvo la mayor concentración espermática, seguido por el tapón copulatorio y el líquido seminal.

Por otra parte, encontramos que independientemente de la estructura seminal, la concentración espermática no varió significativamente entre los eyaculados sucesivos, estos resultados difieren de lo reportado en otros primates, donde la concentración espermática disminuye cuando los machos eyaculan cada hora (Marson et al., 1989) o durante días consecutivos (en un rango de 1 a 6 días), donde la frecuencia de cópulas también disminuye

---

en el transcurso de los días (Knight et al., 1987). En sentido opuesto, Carvalho y colaboradores (2014) reportaron que en el mono aullador, la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides móviles incrementan en función de las eyaculaciones sucesivas.

Los machos macacos cola de muñón muestran la capacidad de eyacular de manera múltiple (Niemeyer y Chamove 1983) y al no variar la concentración espermática entre los eyaculados, se podría sugerir que son primates fisiológicamente adaptados para producir gran cantidad de espermatozoides para hacer frente a la posible competencia espermática, y dado que eyacular es un proceso costoso (Thomsen et al., 2006), no ponen en riesgo la oportunidad de fertilizar al óvulo.

En cualquiera de los casos, se debe tener en cuenta que los machos podrían alterar la cantidad de espermatozoides depositados en el tracto reproductor femenino dependiendo del riesgo de la competencia espermática (Parker y Pizzari 2010; Elgar et al., 2003), la intensidad de la competencia espermática (Parker y Pizzari 2010; Preston y Stockley 2006), la condición de apareamiento de la hembra (hembra virgen o apareada) (Kelly y Jennions 2011; Simmons 2007) o la atracción sexual que el macho tenga por la hembra (Reinhold et al., 2003). Varios estudios experimentales en animales demuestran que cuando dos machos compiten y solo uno de ellos logra aparearse, el número de espermatozoides por eyaculado depositado en el tracto reproductor de la hembra es grande (delBarco-Trillo y Ferkin 2004; Pound y Gage 2004; Pizzari et al. 2003) y la frecuencia de eyaculaciones con la hembra incrementa (Preston y Stockley 2006; Elgar et al., 2003; Ohsawa et al. 1993); pero si a la competencia se suman más rivales, los machos economizan su eyaculado depositándolo en varias hembras (Stockley y Preston 2004). No obstante, como comenté al inicio de la Introducción, en primates, a diferencia de otros organismos (por ejemplo aves: Cornwallis y Birkhead, 2007), representa un reto aplicar algún método que permita obtener las muestras de semen de forma natural, para evaluar la cantidad de esperma eyaculado en las hembras, así como sus características.

La presencia de coágulo seminal o tapón copulatorio es común en sociedades de primates en las que existe intensa competencia espermática, situación frecuente en los sistemas de apareamiento multimacho-multihembra y dispersos (Dixon 1998). Dixon y Anderson (2002) sugieren que en estos sistemas de apareamiento, el tapón copulatorio reduce la probabilidad de que los espermatozoides de un macho entren en competencia con los de otros machos. Un estudio realizado en monos Rhesus (*M. mulatta*) apoya este supuesto, ya que los machos eyaculaban mayor cantidad de tapón copulatorio, el cual se adhirió al contorno del tracto

reproductor de las hembras no gestantes, sin embargo en las hembras gestantes no ocurrió lo mismo (Danzy et al., 2009). Además, algunos primates en estos sistemas de apareamiento también eyaculan coágulo seminal, cuya adaptación parece que ha surgido en respuesta a la hostilidad que les representa el tracto reproductor femenino. Esto porque el coágulo seminal: 1) mantendría vivos a los espermatozoides al alcalinizar el pH del tracto reproductor de la hembra, el cual es particularmente ácido en la fase periovulatoria (Hernández-López et al., 2008; Boskey 1999), 2) minimizaría la pérdida de espermatozoides al retenerlo dentro de la vagina en especies arbóreas (Hernández-López et al., 2008; Dorus et al., 2004) y 3) facilitaría el flujo continuo de los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino (Hernández-López et al., 2008; Suarez y Pacey 2006).

En el caso de *M. arctoides*, encontramos que los machos eyaculan tapón copulatorio y coágulo seminal y que, sin importar el orden de la eyaculación, la frecuencia de emisión del tapón copulatorio es mayor que la del coágulo seminal. Esto permite suponer que los machos presentan adaptaciones fisiológicas que favorecen la formación de ambas estructuras seminales para hacer frente a la intensa competencia espermática y proteger a los espermatozoides dentro del selectivo tracto reproductor femenino (Pitnick et al., 2009). En este último sentido, en primates se ha reportado que el ambiente vaginal es ácido y una vez que los espermatozoides son depositados en el tracto reproductor de la hembra, millones de ellos mueren debido a que su supervivencia depende de ambientes alcalinos y otros más mueren porque son fagocitados por células del sistema inmunológico femenino (Suarez y Pacey 2006; Menge y Edwards 1993).

Dado que encontramos que el coágulo seminal contuvo la mayor concentración espermática, se podría suponer que en él se encuentran los espermatozoides más aptos para fertilizar al óvulo. Esto podría ocurrir porque un estudio en primates reveló que la mayor proporción de espermatozoides viables y con movimiento lineal progresivo estuvieron contenidos en el coágulo seminal (Hernández-López et al., 2002b) y estas características se relacionan con el éxito de fertilidad en mamíferos (Gomendio et al., 2007; Malo et al., 2005). Por su parte, suponemos que el tapón copulatorio, aun cuando contiene espermatozoides, al tener una consistencia dura, podría actuar como una barrera física que obstruya la entrada de los espermatozoides de machos competidores al tracto reproductor de la hembra, como sucede con los monos Rhesus (Danzy et al., 2009). No obstante, para determinar las posibles funciones del coágulo seminal y del tapón copulatorio en *M. arctoides*, es indispensable llevar a cabo varios experimentos. En primera instancia se debería evaluar las diferencias entre las

---

características de los espermatozoides (motilidad espermática, viabilidad, morfología, etc.) contenidos en el coágulo seminal y en el tapón copulatorio. Asimismo, medir la supervivencia espermática de cada estructura seminal, una vez que éstas sean depositadas en el tracto reproductor de la hembra; además de evaluar el grado de flujo y dilución de ambas estructuras dentro del mismo. Por último, para identificar los factores que determinan el éxito de fertilidad en condiciones de competencia espermática, se deberían marcar con distinta fluorescencia los espermatozoides de dos machos e introducirlos en el tracto reproductor femenino. Dado que las características del tracto reproductor de la hembra definen qué rasgos de los eyaculados contribuyen al éxito de fertilidad (Eberhard 1996). Lo que se esperaría es que el macho, cuyos espermatozoides presenten mayor supervivencia a través del tracto reproductor femenino y sobre todo, que se aproximen al óvulo, fuera el contrincante ganador de la contienda espermática. Cabe mencionar que éste tipo de experimentos representan un desafío para evaluar la competencia espermática en acción en primates, debido a la complejidad para utilizarlos como modelo de estudio, a diferencia de otros animales (por ejemplo insectos).

Por otra parte, se conoce que el efecto de la testosterona en la espermatogénesis es fundamental (McLachlan, et al., 2001; Adkins 2005), pero en el presente trabajo no se encontró una relación positiva entre la concentración de testosterona y la concentración espermática, quizá porque la testosterona sérica no refleja precisamente el proceso de espermatogénesis. Jarow y colaboradores (2001) han reportado que la concentración de testosterona es de 25 a 125 veces mayor en los testículos que en el suero sanguíneo. Por lo tanto, valdría la pena obtener muestras de sangre directamente de los testículos para tener un resultado que explique la relación entre esta hormona y la producción espermática en un primate eyaculador múltiple.

Sin embargo, dado que encontramos una relación lineal positiva entre el rango jerárquico y la concentración de testosterona, podría suceder que, como postula la hipótesis del reto (Wingfield et al., 1990), la concentración de testosterona subyazca las interacciones agresivas en los macacos cola de muñón. Relacionado con esto, en especies de primates con reproducción estacional se ha demostrado que la concentración de testosterona de los machos y el número de interacciones agresivas incrementan en presencia de hembras fértiles y no durante otras fases de su ciclo menstrual (Sobolewsk 2013; Ostner et al., 2002; Cavigelli y Pereira 2000). Mientras que en primates con reproducción no estacional, la hipótesis del desafío parece estar regulada por la inestabilidad en los rangos jerárquicos más que por la



competencia intrasexual (Møller 2002; Bergman et al., 2006). Este último resultado es similar a lo encontrado en el presente trabajo, ya que se identificó inestabilidad social en la colonia de macacos cola de muñón, pues, en octubre de 2011 tres machos oscilaron entre distintos rango jerárquico y entre enero y agosto de 2012 ocurrió lo mismo con otros dos animales (Fig. 6).

La mayoría de las especies de primates del Género *Macaca*, viven en sociedades donde se establece jerarquía social lineal, donde los machos dominantes tienen mayor prioridad de acceso a los recursos (por ejemplo, hembras fértiles, alimento y territorio) que los machos subordinados (Bernard et al., 2000; Bergman 2005). Recientemente, un estudio realizado en monos Rhesus reportó que ante un aporte calórico alto los machos mejoran las características del eyaculado (Sitzmann et al., 2010).

En este trabajo, encontramos que cada individuo experimental mostró una capacidad intrínseca distinta ante el mismo estímulo (la electroeyaculación) y en este caso, esa capacidad refleja que existe una similitud entre mis resultados y lo que se ha observado de forma natural en otras especies (Cornwallis y Birkhead, 2007), pues en ambos casos, los machos dominantes tuvieron mayor concentración espermática que los subordinados (aves: Cornwallis y Birkhead, 2007; Kruczek y roedores: Styrna, 2009). Esto nos permiten sugerir que los machos dominante al tener prioridad de acceso a los recursos, consumen mayor cantidad de alimentos altos en calorías que los consumidos por los machos subordinados (por ejemplo, plátanos: 110kcal, mango: 75kcal, guayaba: 50kcal, naranja: 40kcal, jícama: 38kcal), cuyos beneficios o desventajas se podrían ver reflejados en sus eyaculados. Sin embargo, en nuestro trabajo solo se evaluó la concentración espermática, pero no se evaluaron otros parámetros del semen (ej. tipos de motilidad espermática, viabilidad, morfología, etc.). Por lo tanto, en futuros experimentos se deberá evaluarlos para averiguar si, al igual que otras especies, existen estrategias alternativas en el semen de machos subordinados macacos cola de muñón. Un estudio reciente realizado en aves reportan que la motilidad espermática en el semen de machos subordinados es superior a la de los dominantes y además, incrementa a lo largo de las series copulatorias, mientras que la motilidad espermática en machos dominantes disminuyen (Cornwallis y Birkhead, 2007).

Por otro lado, Kruczek y colaboradores (2009) demostraron que en roedores que viven en sistema de apareamiento poligínico, el peso de las vesículas seminales es mayor en machos dominantes que en machos subordinados. Además, experimentos en ratones muestran que la elevación de la concentración de testosterona sérica incrementa: el peso de las vesículas

seminales (Almenara 2000) y la actividad secretora de las vesículas seminales (Higgins y Burchell 1978; Zanato et al., 1994) y a su vez, el decremento en la actividad de estas glándulas resulta en la disminución de la coagulación del semen (Mandal y Bhattacharyya 1985). Relacionado con esto encontramos que en *M. arctoides*, los machos dominantes tienen mayor probabilidad de emitir coágulo seminal y tapón copulatorio en cada eyaculación sucesiva en comparación con los machos subordinados; y no solo esto, sino además el peso total de las fracciones sólidas del semen también fue mayor en los machos dominantes.

Dado que la concentración espermática y la frecuencia de emisión de coágulo seminal y tapón copulatorio fueron mayores en machos dominantes que en subordinados podríamos especular que el macho dominante podría tener mayor éxito reproductivo si monopolizara las cópulas con la hembra receptiva y copulara de manera recurrente con ellas. Así, por una lado, los espermatozoides depositados en el tracto reproductor de las hembras, estarían inmersos y protegidos por el coágulo seminal, haciéndolos más aptos para fertilizar al óvulo (Hernández-López et al., 2008; Boskey 1999); y por otro lado, el tapón copulatorio se podría ajustar en el tracto reproductor femenino durante el candado copulatorio, evitando la competencia espermática (Dixson 1987). Sin embargo, como sucede en otros primates (*Lemur catta*: Parga 2003; *Mandrillus sphinx*: Setchell y Wickings 2004), en algunas ocasiones la hembra podría quitarse el tapón copulatorio una vez finalizada la cópula como parte de su elección de pareja; o bien, el macho durante el cortejo podría extraer el tapón que dejó otro individuo en la hembra. De esta forma, aseguraría el acceso de su eyaculado al tracto reproductor femenino y evitaría dejar el tapón copulatorio de otros competidores lo que evitaría la competencia espermática. Sin embargo, esta es solo una especulación, ya que como he mencionado, se deben realizar más evaluaciones del eyaculado, además de pruebas de paternidad para determinar las adaptaciones fisiológicas que realmente favorece o no, el éxito reproductivo de los machos dominantes sobre la de los subordinados en esta especie de primates.

En general los resultados mostraron que el eyaculado del macaco cola de muñón presentó diferencias en la concentración espermática y éstas se asociaron con el rango jerárquico, el tapón copulatorio fue la estructura emitida con mayor frecuencia, seguida por el coágulo seminal, además de que los machos dominantes presentaron mayor probabilidad de eyacular dichas porciones sólidas. Al parecer, para la fertilización del óvulo, las características de los eyaculados de los machos de alto rango podrían beneficiarlos sobre los eyaculados de machos. No obstante, es sabido que el éxito reproductivo no es exclusivo de los machos de alto rango social. Por tanto, aun queda por evaluar la calidad del semen (motilidad espermática,

viabilidad, morfología, etc.) en este primates, ya que es posible que el eyaculado de los machos subordinados presente una compensación en los mismos que les permita competir por la fertilización del óvulo, por ejemplo que éstos emitan espermatozoides más veloces que los emitidos por los machos dominantes. Además, futuras investigaciones tendrán que abordar la elección críptica realizada por la hembra, ya que el tracto reproductor es el lugar que determina las condiciones en las que los espermatozoides competirán. Finalmente, en primates el estudio experimental de la competencia espermática como la elección críptica siguen siendo temas abierto para la investigación, por tanto, aun cuando represente un gran desafío, se ha de implementar algún modelo que permita estudiarlos.

## 8. CONCLUSIONES

- El eyaculado del macaco cola de muñón (*Macaca arctoides*) está constituido por líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio.
- La concentración espermática del líquido seminal, coágulo seminal y tapón copulatorio variaron significativamente. El coágulo seminal presentó la mayor concentración espermática, seguida por el tapón copulatorio y el líquido seminal.
- La concentración espermática no varió significativamente entre cada eyaculación sucesiva, independientemente de los componentes que forman el eyaculado del macaco cola de muñón.
- El coágulo seminal y el tapón copulatorio no se emitieron en todas las eyaculaciones, aunque la frecuencia de emisión del tapón copularlo fue mayor que la del coágulo seminal.
- El rango jerárquico de los animales en estudio se relacionó positivamente con la concentración espermática en cada eyaculado sucesivo.
- El rango jerárquico de los animales en estudio se relacionó positivamente con la probabilidad de emitir tapón copulatorio, independientemente del orden del eyaculado.
- El rango jerárquico de los animales en estudio se relacionó positivamente con la probabilidad de emitir coágulo seminal en cada eyaculado sucesivo.
- La concentración de testosterona se relacionó positivamente con el peso total del coágulo seminal (coágulo seminal + tapón copulatorio).

## 9. LITERATURA CITADA

- Abbott, D.H., Keverne, E.B., Bercovitch, F.B., Shively, C.A., Mendoza, S.P., Saltzman, W., Snowdon, C.T., Ziegler, T.E., Banjevic, M., Garland, Jr.T., Sapolsky, R.M., 2003. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behaviour* 43: 67–82.
- Adkins, R. E., 2005. *Hormones and animal social behavior*. Princeton University Press, Princeton.
- Alberts, S.C., Buchan, J.C., and Altmann, J. 2006. Sexual selection in wild baboons: from mating opportunities to paternity success. *Animal Behaviour* 72:1177-1196
- Almenara, A., Escalante, G., Gazzo, E., Gonzales, G.F. 2000. Transillumination to evaluate spermatogenesis: Effect of testosterone enanthate in adult male rats. *Archives of Andrology* 46: 21-8.
- Altmann, J. 1974. Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour* 48: 227- 265.
- Andersson, M. 1994. *Sexual selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Anestis, S. F. 2010. Hormones and social behavior in primates. *Evolutionary Anthropology* 19:66-78.
- Baum, M. 2002. Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. In: Becker, J., Breedlove, S.
- Bergman, T. J., Beehner, J. C., Cheney, D. L., Seyfarth, R. M. & Whitten, P. L. 2005. Correlates of stress in free-ranging male chacma baboons, *Papio hamadryas ursinus*. *Animal Behaviour* 70: 703–713.
- Bergman, T., Beehmer, J., Cheney, D., Sevfarth, R., Whitten, P. 2006. Interaction in male baboons the importance of both male's testosterone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 480-489.
- Bermant, G. 1976. Sexual behavior: hard times with the Coolidge effect. In: Siegel MH, Zeigler HP, editors. *Psychological research: the inside story*. New York: Harper and Row; p. 76–103.
- Bernard, T., Andrew, N., Iwaniuk, and Sergio, M. 2000. The influence of phylogeny on the social behaviour of macaques (Primates: Cercopithecidae, genus *Macaca*).
- Bertrand, M. 1969. The behavioral repertoire of the stump-tail macaque: a descriptive and comparative study. Karger, Basel *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*.
- Birkhead, T.R. 1998. Sperm competition in birds: mechanisms and function. In: *Sperm Competition and Sexual Selection* (T. R. Birkhead & A. P. Møller, eds), pp. 579–622. Academic Press, London.
- Birkhead, T.R. and Møller, A.P. 1992. *Sperm competition in birds*. Academic Press, London.
- Birkhead, T.R. y Møller, A.P. 1992. *Sperm competition in birds*. Academic Press, London.
- Birkhead, T.R. y Møller, A.P.1998. *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press, London.
- Birkhead, T.R., Møller, A.P. 1998. *Sperm competition and sexual selection*. San Diego: Academic Press. 826 p.
- Boskey, E.R., Telsch, K.M., Whaley, K.J., Moench, T.R., Cone, R.A. 1999. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and Immunity* 67:5170–5175.
- Brauch, K. 2007 Male and female reproductive strategies in relation to paternity outcome in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). PhD thesis, University of Münster. Göttingen: Cuvellier Verlag.

- Briskie, J.V. y Montgomerie, R. 1992. Sperm size and sperm competition in birds. *Proceeding of the Royal Society of London B* 247: 89-95.
- Brockman, D., and Whitten, P. 1996. Reproduction in free-ranging *Propithecus verreauxi*: Estrus and the relationship between multiple partner matings and fertilizations. *American Journal of*
- Cameron, E., Day, T., and Rowe, L. 2007. Sperm competition and the evolution of ejaculate composition. *The American Naturalist* 169:158-172.
- Carpino, A., Sisci, D., Aquila, T., Beraldi, E., Sessa, M.T., Siciliano L., De Luca, G., Ando, S. 1994. Effects of short-term high dose testosterone propionate administration on medium molecular-weight proteins of human seminal plasma. *Andrologia* 26:241-245.
- Carvalho, F.M., Arakaki, P.R., Nichi, M., Muniz, J.A.P.C., Duarte, J.M.B., Valle, R.R. 2014. Evaluation of sperm quality in successive regular collections from captive black-and-gold howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Animal Reproduction Science* 11(1):11-18.
- Cavigelli, S.A., Pereira, M.E. 2000. Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Hormones and Behavior* 37:246–255.
- Cerda-Molina, A.L., Hernández-López, L., Chavira-Ramírez, R., Cárdenas, M., Mondragón-Ceballos, R. 2009. Seasonality of LH, testosterone and sperm parameters in spider monkey males (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology* 71:427–431
- Chevalier-Skolnikoff, S. 1975. Hererosexual copulatory patterns in stump-tail macaques (*Macaca arctoides*) and in other macaque species. *Archives of Sexual Behavior* 4: 199-220.
- Clarck, L.N., and Swanson, J.W. 2005. Pervasive adaptive evolution in primate seminal proteins. *PLoS Genetics* 1:35.
- Cordero, A. 1990. The adaptive significance of the prolonged copulations of the damselfly, *Ischnura gmelisii* (Odonata: Coenagrionidae). *Animal Behavior* 40: 43-48.
- Cordero, R, A. y Córdoba-Aguilar, A. 2009. Selective forces propelling genitalic evolution in Odonata. In: *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals* (Ed. by J. Leonard & A. Córdoba-Aguilar) Oxford: Oxford University Press.
- Córdoba-Aguilar, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society* 266:779-784.
- Cornwallis, C.K., Birkhead, T.R. 2006. Social status and availability of females determine patterns of sperm allocation in the fowl. *Evolution* 60(7):1486-93.
- Cornwallis, C.K., Birkhead, T.R. 2007. Changes in sperm quality and numbers in response to experimental manipulation of male social status and female attractiveness. *The American Naturalist* (5):758-70.
- Danzy, J., Gutierrez, V., Pampush, J., Campbell, B. 2009. Factors Affecting the Distribution of Copulatory Plugs in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) on Cayo Santiago. *Folia Primatologica; International Journal of Primatology* 80(4):264-274.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of Natural Selection, or the preservation of favored races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Darwin, R. 1871. *The Descent of Man. And Selection in Relation to Sex*. London: John Murray.
- delBarco-Trillo, J., Ferkin, M.H. 2004. Male mammals respond to a risk of sperm competition conveyed by odours of conspecific males. *Nature*. 431:446–449.
- Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwake, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan Behavioral Ecology Advance Access published March 26, 2007
- Di Bitetti, M. S., and Janson, C. H. 2000. When will the stork arrive? Patterns of birth seasonality in Neotropical primates. *American Journal of Primatology* 50: 109-130.
- Dixon, A.F. 1987. Baculum length and copulatory behavior in primates. *American Journal of Primatology* 13:51–60.

- Dixon, A.F. 1995. Sexual selection and ejaculatory frequencies in primates. *Folia Primatol.* 64: 146–152.
- Dixon, A.F. 1998. *Primate Sexuality. Comparative Studies of Prosimians, Monkeys, Apes and Human Beings.* Oxford: Oxford University Press.
- Dixon, A.F. and Anderson, M.J. 2002. Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Folia Primatologica* 73:63–69.
- Dixon, A.F., and Anderson, M.J. 2004. Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiology and Behavior* 83(2):361-71.
- Dorus S., Evans, P.D., Wyckoff, G.J., Choi, S.S., Lahn, B.T. 2004. Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity. *Nature Genetics* 36:1326–1329.
- Dorus, S., Evans, P.D., Wyckoff, G.J., Choi, S.S. y Lahn, B.T. 2004. Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity. *Nature Genetics* 36:1326–1329.
- Drea, C.M. 2005. Bateman Revisited: The Reproductive Tactics of Female Primates. *Integrative and Comparative Biology* 45( 5):915-923.
- Dunbar, R. I. M., and Cowlshaw, G. 1992. Mating success in male primates: dominance rank, sperm competition and alternative strategies. *Animal Behaviour* 44: 1171–1173.
- Dunbar, R. I.M. 2000. Male mating strategies: A modeling approach. In Kappeler, P.M. (ed.), *Primate Males*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 259–268.
- Eberhard, W. 2009. Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10025-10032.
- Eberhard, W.G. 1996. *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice.* Princeton, N.J.: Princeton University Press.
- Elgar, M.A., Champion de Crespigny, F.E., Ramamurthy, S. 2003. Male copulation behaviour and the risk of sperm competition. *Animal Behaviour* 66:211–216.
- Fooden, J. 1990. Classification and distribution of living macaques (*Macaca*). In: Limburg, Short, R. V. *Sexual selection and its component parts, somatic and genital selection, as illustrated by man and the great apes.* *Advances in the Study of Behavior* 9:131-158.
- Fordney-Settlage, D.S., and Hendrickx, A.G. 1974. Observation on coagulum characteristics of the Rhesus Monkey electroejaculate. *Biology of Reproduction* 11: 619-623.
- Gage, M.J.G y Baker, R.R. 1991. Ejaculate size varies with socio-sexual situation in an insect. *Ecological Entomology* 16:331–337.
- Gage, M.J.G. 1994. Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceeding of Royal Society of London B* 258: 247-254.
- Gage, M.J.G. y Baker R.R. 1991. Ejaculate size varies with sociosexual situation in an insect. *Ecology Entomology* 16: 331-337.
- Gammell, M.P., de Vries, H., Jennings, D.J., Carlin, C.M. & Hayden, T.J. 2003. David's score: a more appropriate dominance ranking method than Clutton-Brock et al.'s index. *Animal Behavior* 66: 601-605.
- Garber, P. A. 1997. One for all and breeding for one: Cooperation and competition as a Tamarin reproductive strategy. *Evolutionary Anthropology* 5: 187–199.
- García, M.J.L., Felices, A.U., Povedano, C.M. 2012. *Manual de laboratorio para el análisis del semen Manual analítico y técnico de ayuda al diagnóstico de la esterilidad y subfertilidad de origen masculino y preparación del semen para las técnicas de reproducción asistida.* OmniaScience.
- Ginsberg, J.R. y Rubenstein, D.I. 1990. Sperm competition and variation in zebra mating behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 26: 427–434.

- Goldfoot, D.A., Slob, A.K., Scheffler, G., Robinson, J.A., Wiegand, S.J. 1975. Multiple ejaculations during prolonged sexual test of resultant serum testosterone increased in stump-tail macaques (*M. arctoides*). *Archives of Sexual Behavior* 4: 547-560.
- Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 1991. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceeding of Royal Society of London B* 243: 181-185.
- Gomendio, M., and Roldan, E.R.S. 2008. Implication of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *The International Journal of Developmental Biology* 52:439–447.
- Gomendio, M., Harcourt, A.H. and Roldan, E.R.S. 1998. Sperm competition in mammals. En Birkhead T.R. and Møller A.P. (eds.): *Sperm competition and sexual selection*. Pp. 667-751. Academic Press, San Diego.
- Gomendio, M., Harcourt, A.H. y Roldan, E.R.S. 1998. Sperm competition in mammals. In: *Sperm Competition and Sexual Selection*. T.R. BIRKHEAD and A.P. MØLLER (eds), Academic Press, London, pp 667–751.
- Gomendio, M., Harcourt, A.H., Roldan, E.R.S. 1998. Sperm competition in mammals. In *Sperm Competition and Sexual Selection*. Edited by Birkhead TR, Moller AP. San Diego: Academic Press 667-756.
- Gomendio, M., Roldan, E.R.S. 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *International Journal of Developmental Biology* 52: 439-447.
- Gomendio, M., Malo, A., Garde, J. and Roldan, E. 2007. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134 19–29.
- Gonzales, G.F. 1994. Test for androgen activity at the male reproductive tract in infertile men. *Archives of andrology* 32:235- 242.
- Harrison, R.M. 1980. Semen parameters in *Macaca mulatta*: semen from random and selected monkeys. *Journal of Medical Primatology* 9:265–273.
- Hemelrijk, C.K., Wantia, J., and Gygas, L. 2005. The construction of dominance order: comparing performance of five methods using an individual-based mode. *Behaviour* 142:1037-1058.
- Hernandez-Lopez, L., Cerda-Molina, A.L., Paez-Ponce, D.L., and Mondragon-Ceballos, R. 2008. The seminal coagulum favours passage of fast-moving sperm into the uterus in the black-handed spider monkey. *Reproduction* 136:411–421.
- Hernández-López, L., Cerezo-Parra, G., Cerda-Molina, A.L., Pérez-Bolaños, S.C., Díaz-Sánchez, V and Mondragón-Ceballos, R. 2002b. Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology* 57:3541.
- Higgins, S.J., Burchell, J.M. 1978. Effects of testosterone on messenger ribonucleic acid and protein synthesis in rat seminal vesicle. *Biochemical Journal* 174: 543-51.
- Hosken, D. J., and Ward, P. I.. 2001. Experimental evidence for testis size evolution via sperm competition. *Ecology Letters* 4:10–13.
- Immler, S., Moore, H.D.M., Breed, W.G., and Birkhead, T.R.. 2007. By Hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm. *PLoS One* 2:170.
- Jarow, J.P., Chen, H., Rosner, T.W., Trentacoste, S., Zirkint, B.R. 2001. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *Journal of Andrology* 22: 640–645.
- Jennions, M.D. y Passmore, N.I. 1993. Sperm competition in frogs. Testis size and a serile male experiment on *Chiromantis xerampelina* (Rhacophoridae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 50: 211-220.
- Jolly, C. J., and Phillips-Conroy, J. E. 2003. Testicular size, mating system, and maturation schedules in wild anubis and hamadryas baboons. *International Journal of Primatology* 24:125–142.



- Kanagawa H, Hafez E.S.E., Nawar, M.M., Jaszczak, S. 1972. Patterns of sexual behavior and anatomy of copulatory organs in macaques. *Z Tierpsychol* 31:449–460.
- Kappeler, P. M. 1997b. Intrasexual selection in *Mirza coquereli*: Evidence for scramble competition polygyny in a solitary primate. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41: 115–128.
- Karn, R.C., Clark, N.L., Nguyen, E.D. y Swanson, W.J. 2008. Adaptive evolution in rodent seminal vesicle secretion proteins. *Molecular Biology and Evolution* 25:2301–2310.
- Ke-hui Cui. 1996. The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) *Human Reproduction* 11(3):568-573.
- Kelly, C.D. and Jennions, M.D. 2011. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews* 86: 863-884.
- Kern, A.D., Jones, C.D. y Begun, D.J. 2004. Molecular genetics of male accessory gland in the *Drosophila simulans* complex. *Genetics* 167:725–735.
- Klinkova, E., Hodges, J.K., Heistermann, M. 2008. Urinary glucocorticoid levels in relation to socio-behavioral and reproductive parameters in captive-housed male chimpanzees. *Primate Report* 75.
- Knight, T. W., Gherardi, D., and Lindsay, D.R. 1987 Effects of sexual stimulation on testicular size in the ram. *Animal Reproduction Science* 13:105-1115.
- Koyama, S., and Kamimura, S. 2003. Study on the developmental changes, variance of sperm motility, and social dominance of male mice. *Physiology and Behavior* 80: 267-272.
- Kruczek, M. y Styrna, J. 2009. Semen quantity and quality correlate with bank vole males' social status. *Behavioural processes* 82(3):279-85.
- Kruczek, M., and Styrna, J. 2009. Sperm quantity and quality correlate with bank vole's males social status. *Behavioural Processes* 82: 279–285.
- Lieber, M.M., Barham, S.S., Veneziale, C.M. 1980. In vitro propagation of seminal vesicle epithelial cells. *Investigative Urology* 17: 348.
- Malo, A.F., Garde, J.J., Soler, A.J., García, A.J., Gomendio, M. and Roldan, E.R.S. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 72 822–829.
- Mandal, A., Bhattacharyya, A.K. 1985 Studies on the coagulational characteristics of human ejaculates. *Andrologia* 17: 80-6.
- Mandal, A., Bhattacharyya, A.K. 1987. Differences in osmolality, pH, buffering capacity, superoxide dismutase and maintenance of sperm motility in human ejaculates according to the degree of coagulation. *International Journal of Andrology* 11: 45-51.
- Marson J., Gervais, D., Cooper, R. W., and Jouannet, P. 1989. Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Journal of Reproduction and Infertility* 85: 43-50.
- Massaroto, V.M., Carvalho, F.M., Arakaki, P.R., Calvi, T.S., Nichi, M., Guimarães, M.A.B.V., Miglino, M.A., Valle, R.R. 2010. Collection and analysis of semen from *Callithrix penicillata*. *Primate Research* 26:164.
- McClintock, M.K., Anisko, J.J., Adler, N.T. 1982. Group mating among Norway rats II. The social dynamics of copulation: competition, cooperation, and mate choice. *Animal Behavior* 30:410–25.
- Menge, A.C. and Edwards, R.P. 1993. Mucosal immunity of the reproductive tract and infertility. In Zaz RK (ed.), *Immunology of Reproduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 19–36.
- Møller AP 1989 Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals. *Functional Ecology* 3: 91–96.
- Møller AP. 1988. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates. *Journal of Human Evolution* 17:479-488.

- Møller, A.P. and Birkhead, T.R. 1994. The evolution of plumage brightness in birds is related to extra-pair paternity. *Evolution* 48: 1089-1100.
- Møller, M. N. 2002. Agonistic relations among Kanyawara chimpanzees. In "Behavioural Diversity in Chimpanzees and Bonobos" (c. Boesch, G. Hohmann, and L. Marchant, Eds.), pp. 112-124.
- Møller, M. N., and Wrangham, R. 2001. The reproductive ecology of male hominoids. In "Reproductive Ecology and Human Evolution" (P. Ellison, Ed.), pp. 397-427. Aldine de Gruyter, New York.
- Møller, M.N., Wrangham, R.W., 2004. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the challenge hypothesis. *Animal Behaviour* 67: 111–123.
- Møller, A.P. 1998 Sperm competition and sexual selection. In: Birkhead TR, Møller AP, editors. Sperm competition and sexual selection. San Diego Academic Press p. 55–90.
- Nelson. R.J. 2000. An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Niemeyer, C.L., and Chamove, A.S. 1983. Motivation of harassment of matings in stump-tailed macaques. *Behavior* 87: 298-323.
- NOM-062-ZOO-1999. NORMA Oficial Mexicana Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ohsawa, H., Inoue, M., and Takenata, O. 1993. Mating strategy and reproductive success of male patas monkeys (*Erythrocebus patas*). *Primates* 34: 533-544.
- Oliveira, R. F., Taborsky, M., y Brockmann, H. J. 2008. Alternative reproductive tactics: an integrative approach. Cambridge University Press.
- Olsson, M. 2001. Voyeurism prolongs copulation in the dragon lizard *Ctenophorus fordi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 50: 378–381.
- Oppliger, A., Naciri-Graven, Y., Ribi, G. and Hosken, D.J. 2003. Sperm length influences fertilization success during sperm competition in the snail *Viviparus ater*. *Molecular Ecology* 12: 485-492.
- Ostner, J., and Kappeler, P.M. 2002. Seasonal variation and social correlates of androgen excretion in male red-fronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 52:485–495.
- Ostner, J., Nunn, C., Schülke, O. 2008. Female reproductive synchrony predicts biased paternity across primates. *Behavioral Ecology* 19:1150-1158.
- Parga, J.A. 2003. Copulatory plug displacement evidences sperm competition in *Lemur catta*. *International Journal of Primatology* 24:889–899.
- Parker, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45: 525-567.
- Parker, G.A., and Pizzari, T. 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews* 85(4):897-934.
- Pepelko, W.E. y Clegg, M.T. 1965. Studies of mating behavior and some factors influencing the sexual response in the male sheep *Ovis aries*. *Animal Behavior* 13:557–60.
- Petersen, C.W. y Warner, R.R. 1998. Sperm competition in fishes. En T.R. Birkhead y A.P. Møller (eds.): Sperm competition and sexual selection. Pp: 435-463. Academic Press, San Diego. *Physical Anthropology* 100: 57–69.
- Pitnick, S., Miller, G.T., Reagan, J., Holland, B. 2001. Males' evolutionary responses to experimental removal of sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 268: 1071–1080.
- Pitnick, S., Wolfner, M.F., Suarez, S.S., 2009b. Ejaculate-female and sperm-female interactions. In: Birkhead, T.R., Hosken, D., Pitnick, S. (Eds.), *Sperm Biology and Evolutionary Perspective*. Academic Press, Amsterdam, pp. 248e304.

- Pizzari, T. 2007. Post-insemination sexual selection in birds. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 65:137-54.
- Pizzari, T., Cornwallis, C.K., Løvlie, H., Jakobsson, S., Birkhead, T.R. 2003. Sophisticated sperm allocation in male fowl. *Nature* 426:70–74.
- Pizzari, T., Parker, G.A., 2009. Sperm competition and sperm phenotype. In: Birkhead, T.R., Hosken, D., Pitnick, S. (Eds.), *Sperm Biology and Evolutionary Perspective*. Academic Press, Amsterdam, pp. 207-245.
- Poiani, A. 2006. Complexity of seminal fluid: A review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60:289-310.
- Poiani, A. 2006. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60:289–310.
- Pound, N., Gage, M.J.G. 2004. Prudent sperm allocation in Norway rats, *Rattus norvegicus*: a mammalian model of adaptive ejaculate adjustment. *Animal Behaviour* 68:819–823.
- Preston, B.T., Stockley, P. 2006. The prospect of sexual competition stimulates premature and repeated ejaculation in a mammal. *Current Biology* 16:239–241.
- Reinhold, K., Kurtz, J., Engqvist, L. 2002. Cryptic male choice: sperm allocation strategies when female quality varies. *Journal of Evolutionary Biology* 15(2): 201–209.
- Santillán-Doherty, A. M., Díaz, J.L., and Mondragón-Ceballos, R. 1991. Synergistic effects of kinship, sex and rank in the behavioural interactions of captive stump-tailed macaques. *Folia Primatologica* 56: 177-189.
- Sanz, J.J. 2002. Evolución de los sistemas de apareamiento. En *Evolución: la base de la biología*. (ed.) Proyecto Sur, pp. 271-282.
- Sapolsky R.M. 2005. The influence of social hierarchy on primate health. *Science* 308:648-652
- Sapolsky, R. 2004. *Why Zebras Don't Get Ulcers: A Guide to Stress, Stress-Related Diseases and Coping*. New York: Holt. 3rd ed
- Schulte-Hostedde, A.I. and Millar, J.S. 2004. Intraspecific variation of testis size and sperm length in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*): implications for sperm competition and reproductive success. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55: 272–277.
- Setchel, J.M. and Wickings, E.J. 2004. Sexual swelling in mandrills (*Mandrillus sphinx*): A test of the reliable indicator hypothesis. *Behavior Ecology* 15:438-445.
- Setchell, J.M. 2005. Do female mandrills (*Mandrillus sphinx*) prefer brightly coloured males? *International Journal of Primatology* 26:713–732.
- Simmons, L. W. y Siva-Jothy, M. T. 1998. Sperm competition in insects: Mechanisms and the potential for selection. Pp. 341– 434 in T. R. Birkhead, and A. P. Møller, eds. *Sperm competition and sexual selection*. Academic Press, London.
- Simmons, L. W., Denholm, A., Jackson, C., Levy, E. and Madon, E. 2007. Male crickets adjust ejaculate quality with both risk and intensity of sperm competition. *Biological Letters* 3:520-522.
- Simmons, L.W. 2001. *Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in The Insects*. Princeton University Press, Princeton.
- Simmons, L.W. y Firman, R.C. 2014. Experimental evidence for the evolution of the Mammalian baculum by sexual selection. *Evolution* 68(1):276-83.
- Simmons, L.W., Craig, M., Llorens, T., Schinzig, M. y Hosken, D. 1993. Bushcricket spermatophores vary in accord with sperm competition and parental investment theory. *Proceeding of Royal Society of London B*. 251: 183-186.
- Sitzmann, B., Leone, E.H., Mattison, J.A., Kngram, D.K., Roth, G.S., Urbanski, H.F. Zelinski, M.B., and Otinger, M.A. Effects moderate calorie restriction on testosterone

- production and semen characteristics in young rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Biology of Reproduction* 83(4):635.
- Smith, C.C. 2012. Opposing effects of sperm viability and velocity on the outcome of sperm competition *Behavioral Ecology*. 23: 820–826.
  - Sobolewski, M.E., Brown, J.L., and Mitani, J.C. 2013. Female parity, male aggression, and the Challenge Hypothesis in wild chimpanzees. *Primates* 54: 81-88.
  - Soltis, J., Thomsen, R., Takenaka, O. 2001. The interaction of male and female reproductive strategies and paternity in wild Japanese macaques, *Macaca fuscata*. *Animal Behavior* 62:485–494.
  - Sommer, V., and Reichard, U. 2000. Rethinking monogamy: The gibbon case. In Kappeler, P. M. (ed.), *Primate Males*, University of Cambridge Press, Cambridge, pp. 159–168.
  - Soulsbury, C.D. 2010. Genetic patterns of paternity and testes size in mammals. *Plos One* 5: A152–A157.
  - Stockley P, Preston BT. 2004. Sperm competition and diversity in rodent copulatory behaviour. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1048–1057.
  - Stockley, P. 2012. The baculum. *Current Biology* 22(24): 1032-1033.
  - Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A. y Møller, A.P. 1997. Spermcompetition in fishes: The evolution of testis size and ejaculate characteristics. *The American Naturalist*. 149: 933-954.
  - Stockley, P., Preston, B.T. 2004. Sperm competition and diversity in rodent copulatory behaviour. *Journal of Evolutionary Biology*. 17:1048–1057.
  - Suarez, S.S., Drost, M., Redfern, K., Gottlieb, W. 1990. Sperm motility in the oviduct. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, editors. *Fertilization in mammals*. Norwell: Serono Symposia. pp. 111–124.
  - Suarez, S.S., Pacey, A.A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction* 12:23–27.
  - Swanson, W.J. y Vacquier, V.D. 2002. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Genetics* 3:137–144.
  - Takahashi, H. 2004. Do males have a better chance of mating when the number of estrous females is equal to or greater than the males' ordinal rank? Testing the hypothesis in Japanese macaques. *American Journal of Primatology* 63: 95-102.
  - Terasawa E, Fernandez, D.L. 2001. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocrine Reviews* 22:111–151.
  - Thomsen, R. 2013. Non-invasive collection and analysis of semen in wild macaques. *Primates* 55(2):231-237.
  - Thomsen, R., Soltis, J., Matsubara, M., Matsubayashi, K., Onuma, M. 2006. How costly are ejaculates for Japanese macaques? *Primates* 47(3): 272-4.
  - Tlachi-López, J.L., Eguibar, J.R., Fernández-Guasti, A., Lucio, RA. 2012. Copulation and ejaculation in male rats under sexual satiety and the Coolidge effect. *Physiology and Behavior* 106:626–630.
  - Valle, R.R., Guimaraes, M.A., Muniz, J.A., Barnabe, R.C., Vale, W.G. 2004. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Theriogenology* 62(1-2):131-8
  - Waage, J.K. 1979. Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. *Science* 203: 916-918.
  - Wedell, N., Gage, M.J.G., Parker, G.A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm limited females. *Trends Ecology Evolution* 17:313–320
  - Whalen, R.E. 1963. Sexual behavior of cats. *Behaviour* 20:321–42.
  - Whitten, P.L. 2000. Evolutionary endocrinology of the cercopithecoids. In: Whitehead PF, Jolly CJ (eds) *Old world monkeys*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 269–297.

- Wickings, E.J., Dixon, 1992. Testicular function, secondary sexual development, and social status in male mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Physiology and Behavior* 52:909-917
- Widdig, A., Bercovitch, F.B., Streich, W.J., Sauermaun, U., Nürnberg, P., Krawczak, M. 2004. A longitudinal analysis of reproductive skew in male rhesus macaques. *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society* 271:819–826.
- Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty, Jr.A.M., Ball, G.F. 1990. The “challenge hypothesis”: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *American Society of Naturalists* 136:829–846.
- Yasuoki, T. 2007. Spermatophore displacement and male fertilization success in the ground beetle *Carabus insulicola*
- Zanato, V.F., Martins, M.P., Anselmo-Franci, J.A., Petenusci, S.O., Lamano Carvalho, T.L. 1994. Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian Journal Medecinal and Biological Reserch* 27: 1273-80.

## APÉNDICE

# Effect of photoperiod on characteristics of semen obtained by electroejaculation in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*)

Mónica Dafne García Granados · Leonor Estela Hernández López ·  
Alejandro Córdoba Aguilar · Ana Lilia Cerda Molina ·  
Olivia Pérez-Ramírez · Ricardo Mondragón-Ceballos

Received: 3 October 2013 / Accepted: 8 February 2014  
© Japan Monkey Centre and Springer Japan 2014

**Abstract** Some environmental variables determining seasonal reproduction in mammals are temperature, humidity, food availability, and photoperiod. Among these, photoperiod is considered the main regulator of primates' seasonal reproduction, thus the latitudinal distribution of primate populations is a key factor determining the appearance of seasonal reproduction. The present work presents supporting discrete seasonality in male stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). We investigated whether semen quality and testosterone covaried with Mexico City's photoperiod and relative humidity by analyzing variations in the portions that form the ejaculate: the seminal liquid, the seminal coagulum, and the copulatory plug. Five male adult stump-tailed macaques were electroejaculated once a month, obtaining three semen samples per male, from August 2011 to July 2012 (except for December 2011) ( $n = 165$ ). Our results showed that stump-tailed macaque sperm counts were significantly different between the portions of the ejaculate. The seminal coagulum contained the significantly largest number of spermatozooids, followed by the copulatory plug and the seminal fluid. Photoperiod and relative humidity had major influence on the sperm count in the seminal coagulum and

the testosterone concentrations. Testosterone reached its highest values around the time when days and nights lasted the same hours, decreasing when days either grew longer or became shorter. Concerning relative humidity, sperm counts in the seminal coagulum were highly variable on dry days, but decreased as the relative humidity increased. We conclude that stump-tailed macaques have a discrete seasonality, occurring in spring and fall when macaques' reproductive condition and readiness for postcopulatory intrasexual competition increase.

**Keywords** *Macaca arctoides* · Photoperiod · Relative humidity · Seasonal reproduction

## Introduction

Seasonal reproduction is the temporal distribution of copulations during one period of the year to be followed by births in another period. Three distinct forms of seasonal reproduction are described in primates: (1) *discrete seasonality*, where births occur all year long but more frequently in some seasons or months, such as in *Macaca fuscata*; (2) *strict seasonality*, where copulations only occur in a certain period of the year (the mating season), so consequently births are clustered in a following period; (3) *nonseasonality*, where copulations and births occur throughout the entire year, as seen in lorises, mangabeys, and colobines (Lindburg 1987). Some environmental variables determining seasonal reproduction in mammals are temperature and humidity (Bronson 1988), food availability (Koenig et al. 1997), and photoperiod (Hastings et al. 1985). Among these, photoperiod is considered the main regulator of primates' seasonal reproduction (Koenig et al. 1997; Di Bitetti and Janson 2000; Anderson et al. 2006), thus the latitudinal distribution of

---

M. D. García Granados · L. E. Hernández López (✉) ·  
A. L. Cerda Molina · O. Pérez-Ramírez ·  
R. Mondragón-Ceballos  
Departamento de Etología, Instituto Nacional de Psiquiatría,  
"Ramón de la Fuente Muñiz", Calzada México-Xochimilco 101,  
Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 Mexico, D.F.,  
Mexico  
e-mail: lhl@imp.edu.mx

A. Córdoba Aguilar  
Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F.,  
Mexico

primate populations is a key factor determining the appearance of seasonal reproduction (Di Bitetti and Janson 2000; Anderson et al. 2006).

Although the reproductive biology of the stump-tailed macaque (*M. arctoides*) was studied decades ago, controversy remains regarding some issues. An example of this is reproductive seasonality. Lancaster and Lee (1965) stated that, with the exception of *M. mulatta* and *M. radiata*, which are strictly seasonal (Lindburg 1971; Rahaman and Parthasarathy 1969), the rest of the *Macaca* species show discrete seasonality in both copulation periods and birth periods. Years later, MacDonald (1971) and afterwards Harvey and Rhine (1983) indicated that stump-tailed macaques lack any kind of seasonality, with copulations and births occurring all year long. However, around the same time, Estrada and Estrada (1976) reported three birth peaks in a single year, even though copulations were observed throughout the entire year. More recently, Solanki and Zothansiana (2012) described that captive stump-tailed macaques in Aizawl Zoo (latitude 23°43'N, longitude 92°43'E), India mate from September to February, and births occur from February to August.

Stump-tailed macaques are widely distributed in Southeast Asia, from the northeast subtropical regions of India (latitude 27°50'N, longitude 95°42'E) to equatorial Malaysia (latitude 6°8'N, longitude 100°21'E), occupying habitats that go from sea-level evergreen tropical forests to dry forests at 2500 m above sea level in the Indian Himalayas (Roonwal and Mohonot 1977). Therefore, this species is adapted to survive and reproduce at very diverse latitudes and altitudes, and the disparity in the results of the above-cited studies might correspond to geographical differences.

We studied a captive group of stump-tailed macaques kept in Mexico City (latitude 19°25'N, longitude 99°27'W), which shares geographical coordinates with some Thai (latitude 19°21'N, longitude 98°26'E) populations, therefore being exposed to the same variations in photoperiod. Studies of reproductive seasonality strongly rely on copulation or birth tallies, even when done in captive populations. However, important as these are in providing support to the notion (or not) of seasonal reproduction, it is necessary to investigate deeper into the proximate mechanisms that account for seasonality; For example, in primates showing strict seasonality, throughout the nonmating season reproductive physiology is handicapped, such as the testicular involution observed in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) (Clewe 1969) and rhesus macaques (Wicklins and Nieschlag 1980). Even in species showing discrete seasonality, such as the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*), the endocrine condition in females and males and the sperm quality of males decline throughout the reported birth season in free-

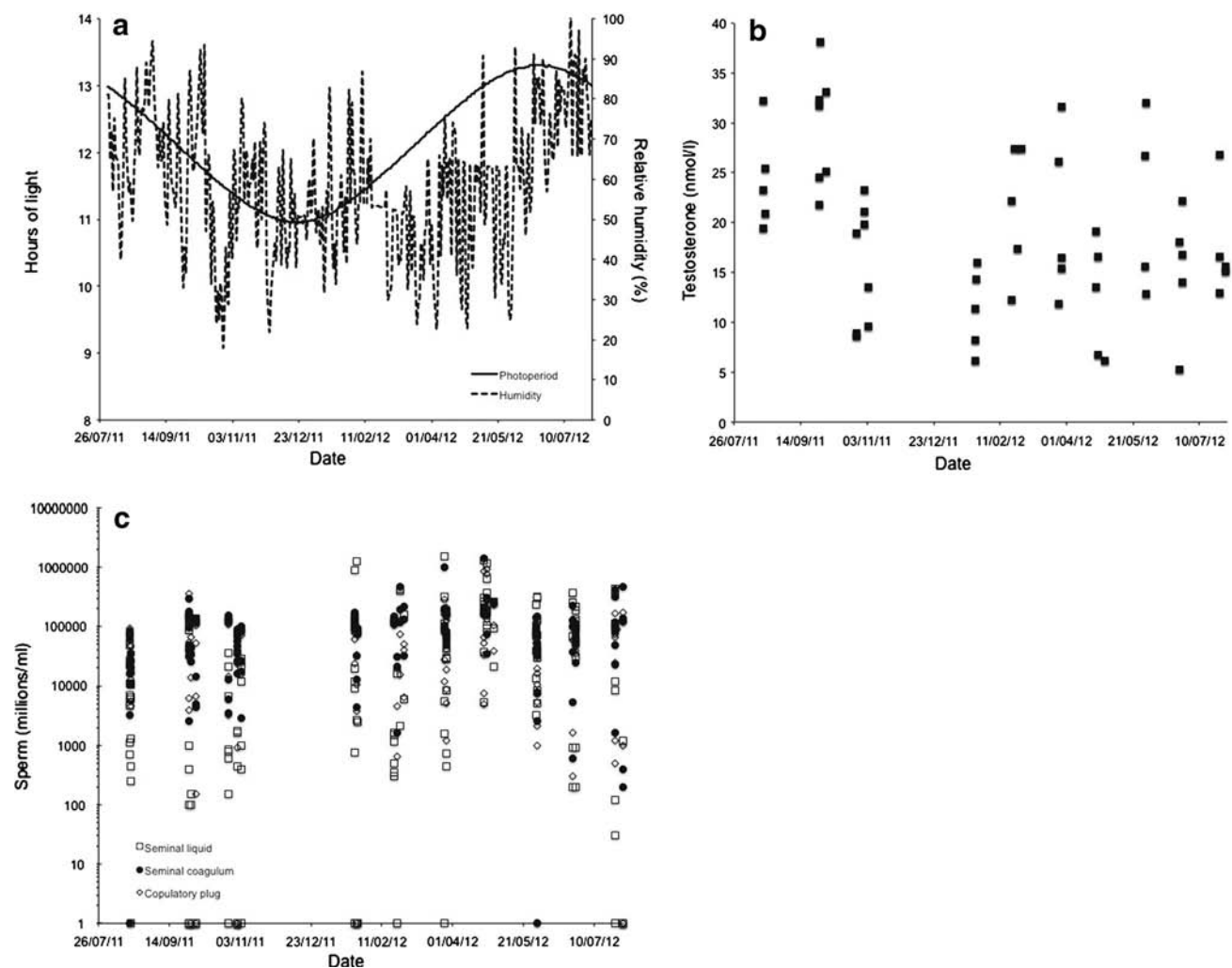
ranging studies (Hernández-López et al. 2002; Cerda-Molina et al. 2006, 2009). Therefore, the objective of this study is to provide evidence of seasonal reproduction in male stump-tailed macaques by investigating whether semen quality covaries with Mexico City's photoperiod and relative humidity. We included these two abiotic variables because changes in photoperiod and relative humidity overlap at this latitude (Fig. 1a). In addition to sperm counts, we also analyzed variations in the components that form the ejaculate: the seminal liquid, the seminal coagulum, and the copulatory plug. Various distinct functions are assigned to the seminal coagulum, the component containing the highest number of spermatozooids. The first is to prevent semen from flowing out of the vagina (Dorus et al. 2004). At the same time, the seminal coagulum allows gradual release of spermatozoa into the vagina, which might extend the chances of fertilization by keeping the ejaculate close to the cervix and promoting a continuous flow of sperm into the female genital tract (Suarez and Pacey 2006). In addition, it has been hypothesized that the evolution of the seminal coagulum is related to intrasexual postcopulatory sperm competition, since its placement inside the vagina can block the passage of other males' sperm (Dixson and Anderson 2002, 2004). On the other hand, the copulatory plug obstructs the passage of rival males' sperm, favoring a male's reproductive chances above others' attempts (Devine 1977; Donald and Dewsbury 1988; Parga 2003). We expected that, if a seasonal increase of sperm counts occurred, it would be accompanied by an increase in emission of the seminal coagulum and the copulatory plug, showing that, besides increased fertility, males are also fit to deal with postcopulatory intrasexual competition.

## Methods

### Animals

Five male adult stump-tailed macaques (*M. arctoides*) were studied. These monkeys live in a large, 1339-m<sup>3</sup> trapezoidal outdoor enclosure (plus additional space provided by six 1.5-m-deep × 6-m-long × 1.8-m-high platforms, chains, a swing, and kindergarten playground objects such as a slide and a running wheel, among others) in the Department of Ethology at the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, in Mexico City. At the time of the study, these males shared the enclosure with 15 adult females, 6 infants, and another adult male. This last male was not included in the study because he was azoospermic. Animals have continuous access to water and are fed standard monkey chow (Monkey Diet 5038; Lab Diet, PMI Foods, Inc., St. Louis, MO, USA) and fresh fruit and





**Fig. 1** **a** Changes in light hours and relative humidity, **b** variations of testosterone concentrations, and **c** variations of sperm found in seminal liquid, seminal coagulum, and copulatory plug throughout the year of study

vegetables once daily. Cage washing was done daily from 08:00 to 09:00 h.

#### Ethics of experimentation

The Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz approved the experimental protocol and animal handling. We also followed the Mexican Official Norm of Technique Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO 1999), and the Policy Statement on Use of Primates for Biomedical Purposes, as adopted by the World Health Organization (WHO) and the Ecosystem Conservation Group (ECG).

#### Semen collection

We carried out 55 experiments (11 per male) throughout August 2011 to July 2012 (except for December 2011). We

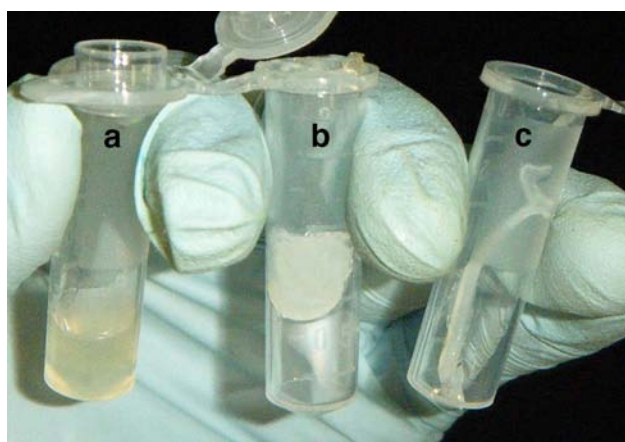
collected semen from each male once monthly. Sampling of all males was done in 3 consecutive days, electroejaculating daily either one or two males. The first semen collection procedure began at 08:00 h, ending around 10:00 h, and the second one was done from 11:00 to 13:00 h. Male stump-tailed macaques are multiple ejaculators, ejaculating several times at short intervals (Bertrand 1969; Kanagawa et al. 1972). Therefore, for each male we collected 3 semen samples in each experimental session, allowing a 10-min postejaculatory interval between successive electroejaculations (total  $n = 165$ ). Semen samples were collected by electroejaculation as previously described (Hernández-López et al. 2002). Males were pre-anesthetized with ketamine chlorohydrate (10 mg/kg i.m.; Anestek CpMAX S.A. de C.V. de Mexico, D.F., Mexico), placed on a surgical bed, and anesthetized with isoflurane.

Briefly, a previously lubricated rectal probe (20 mm diameter, 11 cm long) was introduced into the rectum and positioned near the prostate (~8 cm deep), and electrical

stimuli were delivered. A round of stimuli (starting at 4 V) consisted of 5 electrical stimulations, each one lasting 5 s, followed by a 5 s resting period. In successive rounds of stimulation, the voltage was increased (in increments of 1.0 V) until ejaculation occurred. Simultaneously, the penis was manually stimulated. The entire procedure took no longer than 10 min, and rarely was it necessary to go as high as 6 V to induce ejaculation. After obtaining the 3 successive semen samples, the animal was transported back to the restraining cage until it recovered from the anesthesia. Then it was fed and hydrated, and returned to the outdoor home cage.

### Sperm evaluation

While the animal was ejaculating, according to its consistency (liquid, coagulum or plug), each fraction of the ejaculate was collected in different calibrated Eppendorf tubes (Fig. 2). Following WHO criteria, the sperm concentrations of the seminal liquid, the seminal coagulum, and the copulatory plug were quantified separately in a Neubauer chamber. Previous to assessment, the seminal coagulum and the copulatory plug were dissolved with trypsin at 2.5 %, since most of the spermatozooids are trapped within these gelatinous components. Neubauer chambers were filled with 10  $\mu$ l of each sample. Sperm counting was done using a light microscope (Standard 25 ICS Transmitted Light Microscope; Carl Zeiss, Germany). Sperm was counted twice in each sample; if counts differed by 10 % or more, it was discarded and replaced by a new sample. The use of trypsin prevented us from evaluating sperm motilities in the seminal coagulum and copulatory plug, so in this study we only present the number of spermatozooids per milliliter.



**Fig. 2** Components of stump-tailed macaque ejaculate: **a** seminal liquid, **b** seminal coagulum, and **c** copulatory plug

### Hormonal analyses

We took a 3-ml blood sample per male at the beginning of each experiment for further evaluation of testosterone. Blood was centrifuged at 3000 rpm for 30 min, and the serum stored at  $-20$  °C until further processing. Serum testosterone was measured using a Testosterone Count-Cont 125I radioimmunoassay kit (Immulite DPC, Los Angeles, CA). The intraassay precision coefficient for testosterone was 6.41 %, and the interassay precision coefficient was 9.42 %.

### Weather data

Daily light hours and relative humidity (%) of air for the years 2011 and 2012 in Mexico City were provided by the Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Figure 1a shows the daily variations of the above variables throughout the time of the study. For analyses we used the climatic data corresponding to the days when experiments were carried out.

### Assessment of social rank of males

Behavior data were collected by continuous scan samplings (Altmann 1974) done daily from 10:00 to 12:00 h, annotating the behavior of each group member. Since agonistic interactions were not frequent enough to calculate monthly dominance indexes, we calculated dominance indexes for each 3-month period for all animals in the group except infants. Winner–loser sociomatrices (aggressions given from A to B + submissions received by A from B) were used to calculate David’s dominance scores (Gammell et al. 2003) using the R package “steepness.”

### Statistical analyses

We performed a general linear model test to assess whether males’ social rank or the 3 semen samples collected in each experimental session could bias further analyses of sperm. Sperm counts did not vary significantly throughout the successive electroejaculations [ $F(2,155.06) = 1.64, P = 0.2$ ] or with social rank [ $F(1,4.83) = 1.47, P = 0.3$ ]. Similarly, we found no significant correlation between testosterone values and social rank [ $F(1,4.95) = 0.32, P = 0.6$ ].

To account for cyclic variations, we introduced quadratic terms for light hours and relative humidity in analyses. We analyzed data by means of hierarchical linear mixed (HLM) models or hierarchical logistic generalized estimating equations (GEE), due to the clustered nature of our data. We entered social rank and the three sequential semen collections done in each experimental session as random effects. Successive HLM or GEE models were run;

the first model included only the random effects and the intercept, and in successive models we added first hours of light, then squared light hours, relative humidity, and squared relative humidity. For HLM, Akaike's information criterion (AIC), and for GEE the corrected quasi likelihood under independence model criterion (QICC) were used to evaluate models' goodness of fit, selecting the model with the lowest AIC or QICC as the better one.

Light hours and relative humidity were uncorrelated ( $r = 0.05$ ,  $n = 55$ ,  $P = 0.71$ ). Since neither sperm concentration nor testosterone values were normally distributed, we log-transformed these data for analyses. Whenever the best HLM or best GEE included more than a single significant climatic variable, graphics of results are presented in the form of partial residual plots. Analyses were performed using SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Statistical tests are two-tailed and considered significant at  $P \leq 0.05$ .

## Results

Figure 1b and c shows the variations of testosterone concentrations and sperm counts, respectively, from the seminal liquid, seminal coagulum, and copulatory plug throughout the year of study. It is difficult to visually detect whether the testosterone levels followed some sort of pattern. Sperm counts seemingly decreased on the days before

the onset of summer and increased from late winter to spring, with a small increase observed around the arrival of fall.

Sperm counts were significantly different between the components of the ejaculate [ $F(2,488) = 49.7$ ,  $P < 0.0001$ ]. The seminal coagulum contained the significantly largest number of spermatozoa [mean  $\pm$  standard deviation (SD) =  $10.86 \pm 1.4$  millions/ml], followed by the copulatory plug ( $10.11 \pm 1.4$ ,  $P = 0.024$ ) and the seminal fluid ( $7.7 \pm 1.4$ ,  $P < 0.0001$ ). The numbers of spermatozoa within the copulatory plug were on average significantly higher than found in the seminal fluid ( $P < 0.0001$ ). The copulatory plug is an almost solid, insoluble component that is frequently removed and eaten by the female, so spermatozoa trapped within it have no reproductive value. Similarly, the sperm found in the seminal fluid, except for some dramatic individual increases (Fig. 1c), is too low to substantially contribute to fertility. Therefore, hereinafter we only report sperm concentration results for the seminal coagulum.

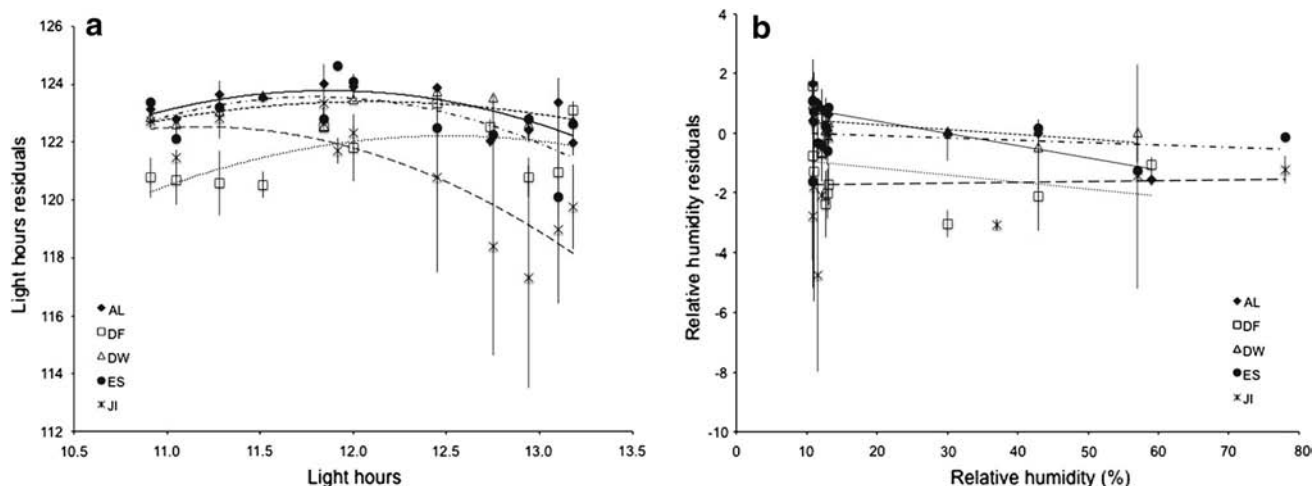
Table 1 presents the HLM models for sperm counts and testosterone. The best model for the number of spermatozoa found in the seminal coagulum included light hours, squared light hours, and relative humidity effects. Figure 3a shows the partial residual plots for light hours and squared light hours on sperm counts in the seminal coagulum for each male. These partial residuals were calculated as follows: light hours residual = residuals +  $20.8 \times$  light

**Table 1** Hierarchical linear models for regressing sperm count and testosterone on climatic variables

Parameter	Sperm count				Testosterone			
	<i>b</i>	SE	<i>t</i>	AIC <sup>a</sup>	<i>b</i>	SE	<i>t</i>	AIC
Model 1								
Intercept	10.74	0.46	23.4**	673.6	2.87	0.09	32.3**	87.0
Model 2								
Intercept	16.08	2.14	7.5**	668.8	1.75	1.02	1.7	88.9
Light hours	-0.44	0.17	-2.6*		0.09	0.08	1.1	
Model 3								
Intercept	-46.66	41.86	-1.1	667.2	-41.55	19.66	-2.1*	86.3
Light hours	10.00	6.96	1.4		7.30	3.27	2.2*	
Squared light hours	-0.43	0.29	-1.5		-0.30	0.14	-2.2*	
Model 4								
Intercept	-111.27	46.56	-2.4*	666.6	-22.11	21.86	-1.0	92.2
Light hours	20.81	7.75	2.7**		4.05	3.64	1.1	
Squared light hours	-0.88	0.32	-2.7**		-0.16	0.15	-1.1	
Relative humidity	-0.02	0.01	-2.9**		0.01	0.00	1.9	
Model 5								
Intercept	-120.87	47.37	-2.6*	679.0	-21.97	22.49	-1.0	107.3
Light hours	22.50	7.90	2.8**		4.02	3.75	1.1	
Squared light hours	-0.95	0.33	-2.9**		-0.16	0.16	-1.0	
Relative humidity	-0.06	0.04	-1.7		0.01	0.02	0.5	
Squared humidity	0.00	0.00	1.1		0.00	0.00	0.0	

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

<sup>a</sup> Akaike's information criterion



**Fig. 3** Partial residual plots for the effects on sperm count within the seminal coagulum due to **a** photoperiod and **b** relative humidity. The contribution of each male to the sperm count variability (mean ± SEM of each successive 3 electroejaculations) is plotted separately: *solid line*, AL; *small dots*, DF; *short dashes*, DW; *dash-dot*, ES; *long dashes*, JI

**Table 2** Hierarchical general estimating logistic equations for emission of seminal coagulum and copulatory plug regressed on climatic variables

Parameter	Seminal coagulum				Copulatory plug			
	<i>b</i>	SE	Wald's test	QICC <sup>a</sup>	<i>b</i>	SE	Wald's test	QICC
Model 1								
Intercept	-0.69	0.23	8.7*	212.0	0.21	0.35	0.4	228.9
Model 2								
Intercept	-16.11	2.66	36.6**	184.8	-8.55	1.77	23.3**	218.3
Light hours	1.26	0.23	30.3**		0.73	0.16	21.8**	
Model 3								
Intercept	49.39	79.18	0.4	185.6	-72.78	50.75	2.1	218.7
Light hours	-9.56	13.08	0.5		11.41	8.45	1.8	
Squared light hours	0.45	0.54	0.7		-0.44	0.35	1.6	
Model 4								
Intercept	-19.63	79.82	0.1	181.7	-172.12	70.82	5.9*	210.6
Light hours	1.98	13.18	0.0		27.98	11.78	5.6*	
Squared light hours	-0.03	0.54	0.0		-1.13	0.49	5.3*	
Relative humidity	-0.03	0.01	21.3**		-0.03	0.01	14.1**	
Model 5								
Intercept	-13.53	81.50	0.0	183.5	-187.55	74.98	6.3*	211.1
Light hours	0.87	13.48	0.0		30.66	12.53	6.0*	
Squared light hours	0.02	0.56	0.0		-1.24	0.52	5.7*	
Relative humidity	0.01	0.02	0.1		-0.08	0.05	2.9	
Squared humidity	0.00	0.00	2.7		0.00	0.00	1.2	

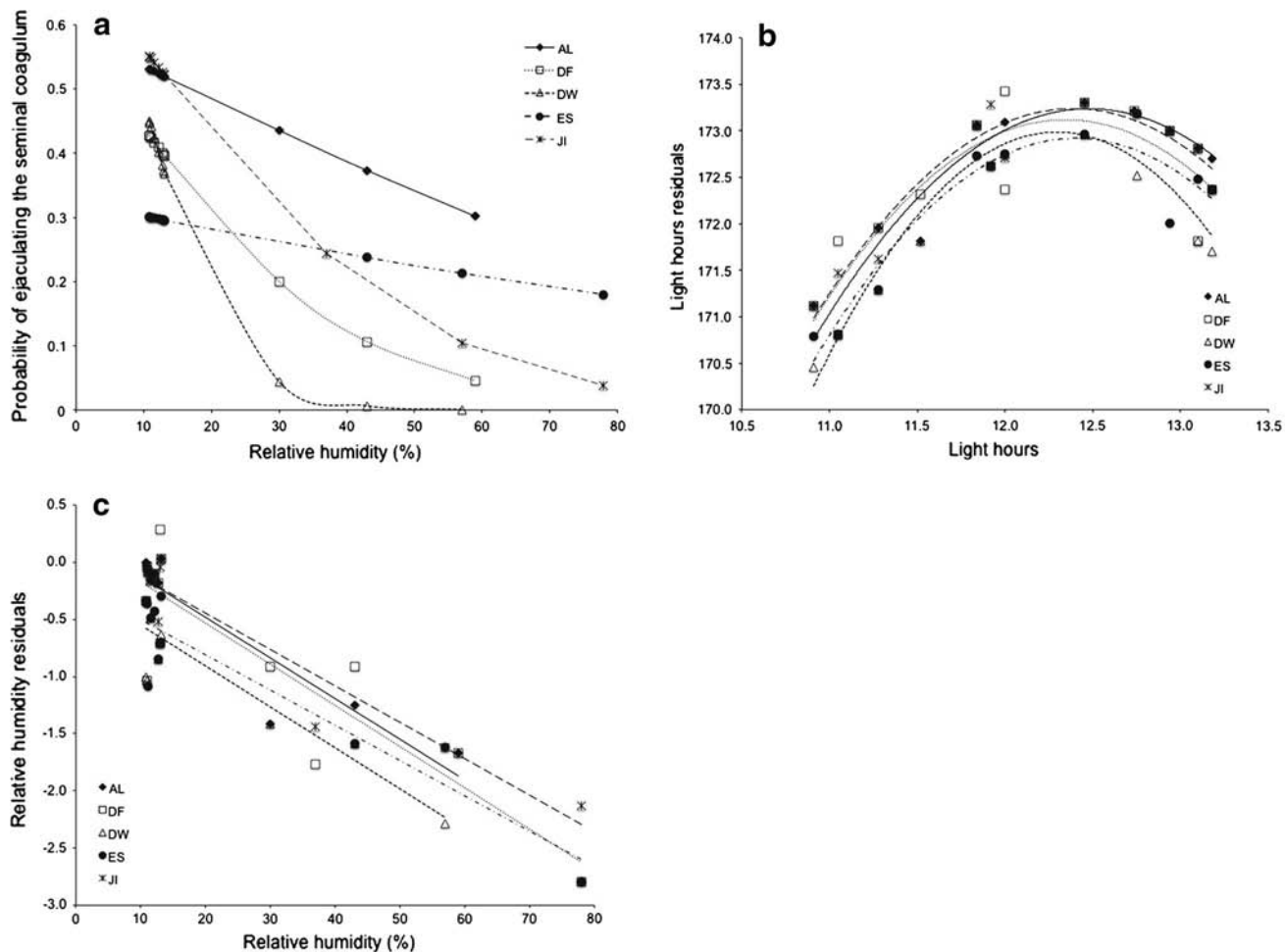
\* *P* < 0.05; \*\* *P* < 0.01

<sup>a</sup> Corrected quasi likelihood under independence model criterion

hours - 0.88 × squared light hours. This high residual value is due to the large slope of the light hours effect. Each data point is the mean ± standard error of the mean (SEM) of the three successive semen collections obtained per animal in a single experimental session. On average, sperm counts increased as the day and night tended to equal length, showing small internal variability between successive collections. As the days grew longer in the summer, sperm counts decreased, and both the between- and within-

male variability increased. Concerning relative humidity, sperm counts in the seminal coagulum (Fig. 3b) were highly variable on dry days but decreased as the relative humidity increased.

Table 2 presents the GEE models for the emission of seminal coagulum and copulatory plug. For both components, the best model included light hours, squared light hours, and relative humidity. However, in the case of the seminal coagulum, only relative humidity had a significant



**Fig. 4** **a** Probability of finding the seminal coagulum in the ejaculate according to relative humidity. **b** Partial residual plot for the odds of ejaculating the copulatory plug regressed on photoperiod. **c** Partial residual plot for the odds of ejaculating the copulatory plug regressed

on relative humidity. Each animal and its trend line are plotted separately. The figures for trend lines in panels **b** and **c** are the same as in panel **a**

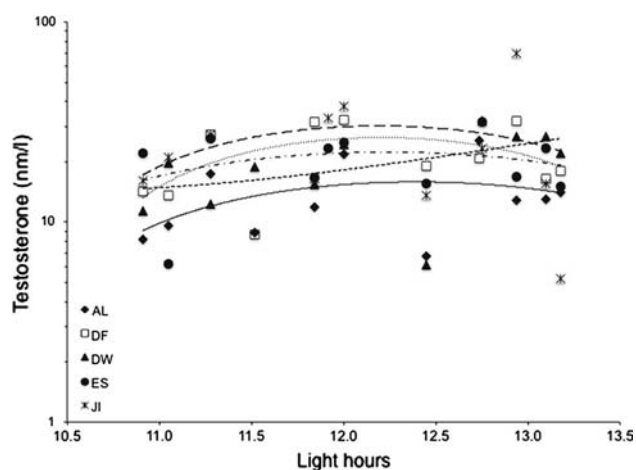
effect on the emission of this portion of the ejaculate. We used logit (odds ratio) residuals to draw partial residual plots. Figure 4a, the partial residual plot for seminal coagulum emission in relation to relative humidity, shows that the odds that this portion was included in the ejaculate decreased as the relative humidity increased. In the case of the copulatory plug, the best model showed that its emission was significantly related to light hours, squared light hours, and relative humidity (Table 2). The highest chance of not ejaculating the copulatory plug occurred on short days, increasing as the day and night became of equal length, and decreasing again as days grew longer than the night (Fig. 4b). Also, the odds that the copulatory plug was emitted were higher on dry days, decreasing as the relative humidity increased (Fig. 4c).

The best model for testosterone variations included both light hours and squared light hours (Table 1). Testosterone levels increased as day and night hours became alike,

decreasing as light hours grew longer or became shorter (Fig. 5).

## Discussion

To our knowledge, this is the first study showing significant variations throughout the year in testosterone, along with sperm concentrations, and the portions that form the ejaculate in stump-tailed macaques. As is known to happen in other species, photoperiod was the principal environmental variable associated with changes in the reproductive physiology of male stump-tailed macaques (Slob et al. 1979). Due to its geographical location, changes in light/dark hours are subtle in Mexico City. However, as Milette and Turek (1986) showed, exposure to 10 min light pulses at dawn and before sunset for several weeks is enough to elicit changes in reproductive physiology. Hence, dramatic



**Fig. 5** Partial residual plot of testosterone values regressed on light hours. Each animal and its trend line are plotted separately. Legends for trend lines are the same as in Figs. 3 and 4

photoperiodic changes are not required to modify melatonin secretion by the pineal gland even in strict seasonal reproducers (e.g., Hoffmann et al. 1981). The relative humidity effects seem spurious in most cases, since the negative relationship between sperm counts and increasing humidity is due to the fact that the heavy showers in Mexico City fall mostly from June to August, also the period of longest days.

Our results show that stump-tailed macaques have a discrete seasonality, since neither testosterone nor sperm concentrations decreased enough in summer (long days) or winter (short days) to render males infertile in these months. Moreover, seasonal animals usually dwell in habitats where the availability of resources changes hugely throughout the year. As mentioned in the “Introduction,” stump-tailed macaques are widely distributed in Southeast Asia, so different populations must experience distinct degrees of vegetal food availability. However, they are able to consume a great variety of foods, including eggs and small reptiles, being considered an omnivorous species. Therefore, the highly adaptive nature of stump-tailed macaques to local conditions might account for its discrete seasonality.

Sperm counts in the seminal coagulum varied seasonally. Despite individual differences, the highest sperm concentrations were found when day and night hours were similar, that is, spring and autumn, while some of the lowest concentrations were seen on the longest days, i.e., summer. Also, the numbers of spermatozoa present in each of the three successive electroejaculations varied greatly as days grew longer, while when days and nights had similar length there was little variation (Fig. 3a). Variations in testosterone levels were akin to sperm counts: higher in spring and autumn, and lower in winter and summer. When the weather was more humid, the emission of the seminal coagulum

decreased, without its emission being significantly affected by photoperiod. Therefore, our results show that the presence of this component decreased in the summer. Seemingly, the main function of the seminal coagulum of stump-tailed macaques is as a reservoir of spermatozooids to keep the largest amount of these bundled in a soft gelatinous lattice, protecting them from adverse vaginal conditions and close to the cervix. Vaginal acidity is the first chemical barrier encountered by spermatozooids on their way through the female reproductive tract (Boskey et al. 1999). As such, the seminal coagulum forms a barrier between the spermatozooids and the acid vaginal milieu characteristic of the female periovulatory phase, which enhances sperm survival and its journey to the uterus (Bauman et al. 1982; Papka and Williams 1998; Boskey et al. 1999, 2001). Regarding the copulatory plug, the likelihood of being present in the ejaculate was lower when days were short (winter), being higher when days and night had similar length, but its occurrence decreased as days grew longer. We think that the copulatory plug has the same function described in other species, i.e., to block inseminations of rival males. Stump-tailed macaque groups are multifemale–multimale, where receptive females are able to copulate with more than one male, leading to strong male–male competition (Hrdy 1979; De Waal 1989; Small 1993; Miller 1998).

In summary, we found that, in male stump-tailed macaques, reproductive condition and readiness for post-copulatory intrasexual competition increase mainly in spring, but also in fall. However, additional study of the variation in females’ reproductive condition throughout the year is required (and in progress) to confirm the present results.

**Acknowledgments** This research project was supported by the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. We thank Javier Borráz León and Gema Estudillo for their valuable help with laboratory work. We thank Mrs. Sally Packard for correcting the English version of the manuscript. Concerning experimentation ethics, the Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz approved the experimental protocol and animal handling. We also followed the Mexican Official Norm of Technique Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO 1999), and the Policy Statement on Use of Primates for Biomedical Purposes, as adopted by the World Health Organization (WHO) and the Ecosystem Conservation Group (ECG).

## References

- Altmann J (1974) Observational study of behaviour: sampling methods. *Behaviour* 49:227–267
- Anderson DP, Nordheim EV, Boesch C (2006) Environmental factors influencing the seasonality of estrus in chimpanzees. *Primates* 47:43–50
- Bauman JE, Kolodny RC, Webster SK (1982) Vaginal organic acids and hormonal changes. *Fertil Steril* 38:572–579

- Bertrand M (1969) The behavioral repertoire of the stump-tail macaque: a descriptive and comparative study. Karger, Basel
- Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR (2001) Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* 16:1809–1813
- Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA (1999) Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun* 67:5170–5175
- Bronson FH (1988) Seasonal regulation of reproduction in mammals. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction*. Raven, New York, pp 1831–1873
- Cerda-Molina AL, Hernández-López L, Chavira-Ramírez R, Cárdenas M, Mondragón-Ceballos R (2009) Seasonality of LH, testosterone and sperm parameters in spider monkey males (*Ateles geoffroyi*). *Am J Primatol* 71:427–431
- Cerda-Molina AL, Hernández-López L, Páez-Ponce LD, Rojas-Maya S, Mondragón-Ceballos R (2006) Seasonal variations of fecal progesterone and 17 $\beta$ -estradiol in captive female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Theriogenology* 66:1985–1993
- Clewe TH (1969) Observations on reproduction of squirrel monkeys in captivity. *J Reprod Fertil* 6:151–156
- de Waal FBM (1989) *Peacemaking among primates*. Harvard University Press, Cambridge
- Devine CM (1977) Copulatory plug restricted mating opportunities and reproductive competition among male garter snakes. *Nature* 267:245–246
- Di Bitetti MS, Janson CH (2000) When will the stork arrive? Patterns of birth seasonality in Neotropical primates. *Am J Primatol* 50:109–130
- Dixon AF, Anderson MJ (2002) Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates. *Folia Primatol* 73:63–69
- Dixon AF, Anderson MJ (2004) Sexual behavior, reproductive physiology and sperm competition in male mammals. *Physiol Behav* 83:361–371
- Donald A, Dewsbury A (1988) A test of the role of copulatory plugs in sperm competition in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Mammal* 69:854–857
- Dorus S, Evans PD, Wyckoff GJ, Choi SS, Lahn BT (2004) Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity. *Nat Genet* 36:1326–1329
- Estrada A, Estrada R (1976) Birth and breeding cyclicity in an outdoor living stump-tail macaque (*Macaca arctoides*) group. *Primates* 17:225–231
- Gammell MP, de Vries H, Jennings DJ, Carlin CM, Hayden TJ (2003) David's score: a more appropriate dominance ranking method than Clutton-Brock et al.'s index. *Anim Behav* 66:601–605
- Harvey NC, Rhine RJ (1983) Some reproductive parameters of stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). *Primates* 24:530–536
- Hastings MH, Roberts AC, Herbert J (1985) Neurotoxic lesions of the anterior hypothalamus disrupt the photoperiodic but not the circadian system of the Syrian hamster. *Neuroendocrinol* 40:316–324
- Hernández-López L, Cerezo-Parra G, Cerda-Molina AL, Pérez-Bolaños SC, Díaz-Sánchez V, Mondragón-Ceballos R (2002) Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *Am J Primatol* 57:35–41
- Hoffmann K, Illnerová H, Vaněček J (1981) Effect of photoperiod and of one minute light at night-time on the pineal rhythm on N-acetyl transferase activity in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Biol Reprod* 24:551–556
- Hrdy SB (1979) Infanticide among animals: a review, classification, and examination of the implications for the reproductive strategies of females. *Ethol Sociobiol* 1:13–40
- Kanagawa H, Hafez ESE, Nawar MM, Jaszczak S (1972) Patterns of sexual behavior and anatomy of copulatory organs in macaques. *Z Tierpsychol* 31:449–460
- Koenig A, Borrie C, Chalise MK, Winkler P (1997) Ecology, nutrition, and the timing of reproductive events in an Asian primate, the Hanuman langur (*Presbytis entellus*). *J Zool* 243:215–235
- Lancaster JB, Lee RB (1965) The annual reproductive cycle in monkeys and apes. In: DeVore I (ed) *Primate behavior: field study of monkeys and apes*. Academic, New York, pp 486–513
- Lindburg DG (1971) The rhesus monkey in north India: an ecological and behavioral study. In: Rosenblum LA (ed) *Primate behavior: developments in field and laboratory research*. Academic, New York, pp 1–106
- Lindburg DG (1987) Seasonality of reproduction in primates. In: Erwin J, Mitchell G (eds) *Comparative Primate Biology*. Alan R. Liss, New York, pp 167–218
- MacDonald GJ (1971) Reproductive patterns in three species of macaques. *Fertil Steril* 22:373–377
- Millette JJ, Turek FW (1986) Circadian and photoperiodic effects of brief light pulses in male Djungarian hamsters. *Biol Reprod* 35:327–335
- Miller GF (1998) How mate choice shaped human nature: a review of sexual selection and human evolution. In: Crawford C, Krebs D (eds) *Handbook of evolutionary psychology: Ideas, issues and applications*. Lawrence Erlbaum, New Jersey, pp 87–129
- Papka R, Williams S (1998) Vagina. In: Knobil E, Neill JD (eds) *Encyclopedia of reproduction*. Academic, San Diego, pp 961–968
- Parga JA (2003) Plug displacement evidences sperm competition in *Lemur catta*. *Int J Primatol* 24:889–899
- Rahaman H, Parthasarathy MD (1969) Studies on the social behavior of bonnet monkeys. *Primates* 10:149–162
- Roonwal ML, Mohonot SM (1977) *Primates of South Asia: ecology, sociobiology and behavior*. Harvard University Press, Cambridge
- Slob AK, Ooms MP, Vreeburg JTM (1979) Annual changes in serum testosterone in laboratory housed male stump-tail macaques (*M. arctoides*). *Biol Reprod* 20:981–984
- Small M (1993) *Female choices: sexual behavior of female primates*. Cornell University Press, New York
- Solanki GS, Zothansiana (2012) Male homosexual behavior among different age groups in captive stump-tailed macaque (*Macaca arctoides*): socio-sexual or sexually motivated? *Int Multidiscip Res J* 2:22–27
- Suarez SS, Pacey AA (2006) Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod* 12:23–37
- Wicklins EL, Nieschlag E (1980) Seasonality in endocrine and exocrine testicular function of the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*) maintained in a controlled laboratory environment. *Int J Androl* 3:87–104